

**RAFAELA LENZI FOGAÇA**

**Identificação de mimotopos de *Taenia saginata*:  
caracterização e aplicação no diagnóstico da cisticercose  
bovina**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

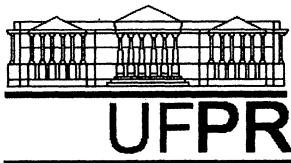
Área de concentração: Saúde Humana e Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Juliana Ferreira de Moura

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Larissa Magalhães  
Alvarenga

**CURITIBA**

**2013**



## RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos oito dias do mês de março de 2013, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, segundo andar do prédio da Administração, no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Septuagésima Quarta Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Prof Dr Bonald Cavalcante de Figueiredo (UFPR / Instituto Pelé Pequeno Príncipe), Prof Dr Luiz Felipe Caron (UFPR), e Profª Drª Juliana Ferreira de Moura (UFPR- orientadora da dissertação).

Às 9h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Rafaela Lenzi Fogaça** a fazer a apresentação da dissertação intitulada: **"Identificação de mimotopos de *Taenia saginata*: caracterização e aplicação no diagnóstico da cisticercose bovina"**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Prof Dr Bonald Cavalcante de Figueiredo, Prof Dr Luiz Felipe Caron e Profª Drª Juliana Ferreira de Moura declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 8 de Março de 2013.

Prof Dr Bonald C de Figueiredo

Prof Dr Luiz Felipe Caron

Profª Drª Juliana Ferreira de Moura

Universidade Federal do Paraná  
Setor de Tecnologia  
Curso de Doutorado em Processos  
Biotecnológicos

Aos meus pais Eliete e Rosalvo, e às minhas irmãs,  
Manuela, Camila e Carolina,  
pelo amor e cumplicidade incondicionais  
neste e em todos os projetos dos quais participo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha mãe e ao meu pai por estarem ao meu lado nos momentos mais complicados da minha vida sempre com muita paciência e me dando forças, carinho e palavras de incentivo para continuar trilhando o caminho com muita garra.

Às minhas maravilhosas irmãs Manuela, Camila e Carolina por entenderem os momentos em que tive que estar ausente e por todo o amor e carinho que me são concedidos.

Ao programa de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade e ao plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais – REUNI, pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Ferreira de Moura, pela orientação, incentivo e ensinamentos concedidos, mas, sobretudo pela confiança na minha capacidade de seguir o caminho científico e compreensão em relação às minhas limitações. Sou muito grata por ter você no meu caminho.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga, pela orientação, disposição, clareza de suas sugestões e pelos puxões-de-orelha realizados nos momentos certos. Você é um exemplo de disciplina e de trabalho feito com muito prazer.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Silvio Zanata, do Laboratório de Neurobiologia (Departamento de Patologia Básica – UFPR), à Prof<sup>a</sup>. Dra. Edilene Alcântara de Castro, do Laboratório de Parasitologia Molecular (Departamento de Patologia Básica – UFPR) e ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Carlos Ricardo Soccol, do Laboratório de Processos Biotecnológicos (Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – UFPR), pelos equipamentos e inúmeros materiais emprestados.

A Dra. J. K. Scott, pelas bibliotecas de fagos concedidas.

À Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol (Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – UFPR) pela soroteca bovina gentilmente cedida.

Ao Dr. João Carlos Minozzo, do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI da Secretaria de Estado da Saúde/PR, pelo fornecimento de antígeno de *T. longicollis* para os testes imunoenzimáticos e auxílio nas imunizações.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Luiz Felipe Caron e Prof. Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, que tão gentilmente aceitaram ler esse trabalho e avaliá-lo.

À mestre Janaína Capelli Peixoto pelos experimentos prévios realizados, fundamentais para a elaboração do meu projeto de pesquisa.

À doutoranda, aos mestrandos e aos alunos de iniciação científica, do Laboratório de Imunoquímica (Departamento de Patologia Básica – UFPR) pela amizade, risadas, ensinamentos científicos e orientações concedidas. Trabalhar no laboratório e realizar os experimentos foi muito mais prazeroso na companhia de vocês.

Aos meus maravilhosos amigos que estão presentes nos melhores momentos da minha vida, me fazendo rir, não deixando de me dar apoio e quando necessário.

E por fim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, principalmente aos colegas da UFPR: que tornaram meus dias muito mais agradáveis!

MUITO OBRIGADA!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém ainda pensou  
sobre aquilo que todo mundo vê.”*

- Arthur Schopenhauer -

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	viii
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b>	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	x
<b>RESUMO</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
2.1 Complexo Teniose-cisticercose	14
2.1.1 Aspectos Morfológicos e Biológicos	14
2.1.2 Ciclo Biológico	17
2.1.3 Aspectos Epidemiológicos	18
2.1.4 Controle e Profilaxia	20
2.1.5 Erradicação	21
2.2 Cisticercose Bovina	22
2.2.1 Inspeção Sanitária da Carcaça Bovina	23
2.2.2 Prevalência da Cisticercose Bovina	27
2.2.3 Rastreabilidade Bovina	32
2.3 <i>Phage Display</i>	35
2.3.1 Fagos Filamentosos	35
2.3.1.1 Estrutura	35
2.3.2 Biblioteca	36
2.3.3 Ciclo de Vida	37
2.3.4 Exposição de Peptídeos em Fagos Filamentosos	37
2.3.2 Seleção	38
2.3.2.1 Formas de Seleção	39
2.3.3 Aplicações Biotecnológicas de Peptídeos Obtidos por <i>Phage Display</i>	40
<b>3. OBJETIVOS</b>	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos Específicos	45
<b>4. METODOLOGIA</b>	46
4.1 Preparo do Antígeno	46
4.2 Soro anti-metacestódeo de <i>T. saginata</i>	46
4.3 Preparo de Imunoglobulinas Específicas	47
4.4 Imunoscreening das Bibliotecas de <i>Phage Display</i>	48
4.5 Análise de Enriquecimento de Biopannings e Screening de Peptídeos de <i>Phage Display</i>	49
4.6 ELISA Indireto para a Determinação de Anticorpos Anti-Peptídeo	50
4.7 Ensaio de Competição	51
4.8 SPOT síntese e ALA scanning	52
4.9 Análise <i>In Silico</i>	53
<b>5. RESULTADOS</b>	54
5.1 Imunoseleção de Soros Positivos para Cisticercose por ELISA Indireto	54

5.2 Enriquecimento de Fagos Ligantes de Anticorpos Anti-TsCa e Análise de Reatividade	54
5.3 Prevalência das Sequencias de Mimotopos de <i>T. saginata</i>	55
5.4 Comparação entre a antigenicidade de TsCa e Mimotopos Obtidos por <i>phage display</i>	57
5.5 Ensaios de Competição	59
5.6 ALA Scanning	61
5.7 Análise de Sequencia	64
<b>6. DISCUSSÃO</b>	66
<b>7. CONCLUSÃO</b>	72
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	73
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	74



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Foto de <i>Taenia saginata</i> evidenciando as ventosas e o rostro sem acúleos.	15
FIGURA 2: Ovos de <i>T. saginata</i> .	16
FIGURA 3: Ciclo biológico da <i>T. saginata</i> .	18
FIGURA 4: Foto de cisticerco presente em músculo bovino.	24
FIGURA 5: Mapa epidemiológico demonstrando a prevalência da cisticercose bovina em gados abatidos de acordo com os estados brasileiros durante o período de janeiro de 2007 a abril de 2012.	31
FIGURA 6: Estrutura do bacteriófago filamentoso.	35
FIGURA 7: Esquema do ciclo de seleção ou <i>Biopanning</i> .	37
FIGURA 8: Esquema representativo do ensaio de ELISA utilizado para seleção de soros bovinos positivos para cisticercose.	
FIGURA 9: Esquema representativo do ensaio de ELISA utilizado para avaliar o enriquecimento dos <i>biopannings</i> .	
FIGURA 10: Esquema representativo do ensaio de ELISA utilizado para avaliar a antigenicidade dos peptídeos selecionados por <i>phage display</i> .	
FIGURA 11: Esquema representativo de ensaio de ELISA de competição.	

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: DESTINO DE CARCAÇAS COM CISTICERCOSE.	27
TABELA 2: DISTRIBUIÇÃO E PREVALÊNCIA DA CISTICERCOSE BOVINA POR ESTADO DO BRASIL.	29
TABELA 3: SEQUENCIA, PREVALÊNCIA E RESÍDUOS MAIS FREQUENTES DE MIMOTOPOS OBTIDOS POR <i>PHAGE DISPLAY</i> .	53
TABELA 4: ANÁLISE DA IDENTIDADE DOS MIMOTOPOS OBTIDOS POR <i>PHAGE DISPLAY</i> .	61

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Enriquecimento e reatividade dos peptídeos obtidos por <i>phage display</i> selecionados por anticorpos anti-antígeno bruto de metacestódeo de <i>T. saginata</i> após 5 ciclos de seleção.	52
GRÁFICO 2: Comparação de reatividade entre TsCa e mimotopos obtidos por <i>phage display</i> .	55
GRÁFICO 3: ELISA de competição.	57
GRÁFICO 4: Scanning por alanina de 3 peptídeos lineares selecionados por <i>phage display</i> em uma membrana de SPOT.	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
ALA	Alanina
BC	<i>Bovine Cysticercosis</i>
<i>Biopannings</i>	Ciclos de Seleção
BNT's	Barreiras Não-Tarifárias
BSA	Albumina de Soro Bovino
CPPI	Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ELISA	Ensaio Imunoenzimático ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mer	Número de aminoácidos
OPD	Ortofenilenodiamina
<i>Overnight</i>	Período que equivale de 12 a 16 horas
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBS - T	Tampão Fosfato Salino com adição do detergente Tween 20
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
Rpm	Rotações por minuto
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SISBOV	Serviço Brasileiro de Rastreabilidade da Cadeia Produtiva de Bovinos e Bubalinos
Tsag	Mimotopos de <i>Taenia saginata</i> obtidos nesse trabalho
TsCa	Antígeno Bruto de <i>Taenia saginata</i>
TU	<i>Transductional unit</i>
UI	Unidade Internacional

## RESUMO

A cisticercose é uma importante doença parasitária provocada pelo desenvolvimento dos metacestodeos de *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*) em tecidos bovinos. Essa doença causa enormes prejuízos à pecuária de corte e é considerada como um grande problema de saúde pública. Ensaaios diagnósticos sensíveis e precisos para detecção da parasitose no animal vivo e programas de vacinação permanecem como um desafio. O objetivo desse estudo foi utilizar peptídeos expostos em superfícies de bacteriófagos, previamente selecionados, em imunoensaaios de ELISA avaliando soros de bovinos positivos e negativos para a cisticercose na tentativa de encontrar um bom antígeno para ser usado na detecção *ante-mortem* da cisticercose. Usando a tecnologia de *Phage Display*, obtivemos 8 mimotopos que apresentaram alta reatividade frente ao soro de bovinos positivos para cisticercose. Dentre as sequências apresentadas por estes clones, os aminoácidos que apresentaram maior prevalência foram a prolina, a treonina, a alanina e a arginina. Quando estes aminoácidos foram substituídos por alanina ou serina, no ensaio de Ala scan realizado com os mimotopos Tsag 1, Tsag 2 e Tsag 3, ocorreu diminuição da reatividade destes peptídeos, evidenciando a importância da presença desses aminoácidos. Avaliando o potencial antigênico dos mimotopos obtidos frente a soros de bovinos positivos e negativos, obtivemos um mimotopo, o Tsag 3, com alta correlação em relação ao antígeno bruto de *C. bovis* na identificação de animais positivos e negativos. Os nossos resultados demonstram que a tecnologia de *Phage Display* é eficiente na seleção e identificação de peptídeos reativos à anticorpos de interesse, bem como na identificação de bovinos infectados por *C. bovis*.

Palavras-chave: *Phage Display*, Cisticercose bovina, *Cysticercus bovis*, *Taenia saginata*.

## ABSTRACT

Cysticercosis is an important parasitic disease caused by metacestodes of *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*) that affects bovine animals. This disease cause great economic loss to cattle and present an impact on the public health system. Sensible and accurate diagnostic methods for the detection of the etiological agents of cysticercosis in infected animals, as well as the implementation of vaccination programmes remain a challenge. The present study aims the use of peptides phage displayed, that were previously selected, in ELISA immunoassays evaluating positive and negative bovine serum for cysticercosis in an attempt to find a good antigen to be used in an *ante-mortem* detection of cysticercosis. Using the *Phage Display* technology, we obtained 8 mimotopes that presented a high reactivity to bovine serum positive for cysticercosis. Among the sequences presented by these clones, the aminoacids with most prevalence was proline, threonine, alanine and arginine. When these aminoacids were substituted by alanine ou serine, Ala scan assay developed with the mimotopes Tsag 1, Tsag 2 and Tsag 3, there was diminution of the reactivity of the peptides, evidencing the importance of their presence. Evaluating the antigenic potencial of the mimotopes with positive and negative bovine serum, we obtained one mimotope, Tsag 3, that presented high correlation with the *C. bovis* crude antigen. Our results demonstrate that the *Phage Display* technology is efficient by selecting and identificating peptides that react with antibodies of interest, as well as identificating bovine infected with *C. bovis*

Keywords: *Phage Display*, bovine cysticercosis, *Cysticercus bovis*, *Taenia saginata*.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O complexo teniose/cisticercose é uma zoonose que possui distribuição mundial. Em seu ciclo biológico dois hospedeiros estão envolvidos: o homem, hospedeiro definitivo das *Taenia saginata* e *Taenia solium*, e os bovinos e suínos, hospedeiros intermediários dos metacestodas *Cysticercus bovis* e *Cysticercus cellulosae* respectivamente (REY, 2001; MACHADO, 1999; JUNIOR E BITTENCOURT, 2005).

A cisticercose bovina responsável por causar grandes prejuízos para o agronegócio apresenta alta prevalência nos estados do Sul e Sudeste do Brasil (ABIEC, 2012; DUTRA *et al.* 2012). A inspeção visual *post mortem* da carcaça é o método atualmente utilizado para a detecção de cisticercos mas apresenta baixa sensibilidade (MINOZZO, 2002; LOPES, 2011; SOARES, 2011).

O uso de extratos antigênicos vem sendo experimentalmente utilizado para o diagnóstico da doença. A dificuldade na obtenção de bons extratos e na sua padronização torna crescente a busca por novas metodologias que auxiliem na identificação de proteínas específicas a serem utilizadas na identificação *in vivo* dos animais parasitados (MINOZZO, 2004).

A técnica de *Phage Display* apresenta várias aplicações biotecnológicas, dentre elas podemos citar, o diagnóstico de algumas doenças. Essa metodologia poderia ser útil na obtenção de mimotopos reconhecidos por anticorpos bovinos anti-*C. bovis*, para serem empregados no diagnóstico *ante-mortem* da cisticercose bovina e também para gerar peptídeos sintéticos que possam ser empregados em um futuro próximo em programas de imunização (CAPELLI-PEIXOTO, 2011).

A presente dissertação descreve a avaliação do potencial antigênico de bacteriófagos que expressam sequências aminoacídicas específicas na detecção de anticorpos bovinos contra *C. bovis*, na tentativa de encontrar bons antígenos que possam ser utilizados no diagnóstico bovino da cisticercose.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 COMPLEXO TENIOSE-CISTICERCOSE**

As doenças relacionadas ao complexo teniose-cisticercose afetam o ser humano e alguns animais, como o suíno e o bovino, que vivem próximos ao homem e que são por ele utilizados em sua alimentação. A *Taenia solium* e a *Taenia saginata* são os dois helmintos parasitas causadores da zoonose denominada de teniose em humanos (MACHADO, 1999; JUNIOR E BITTENCOURT, 2005; MS, 2008).

A teniose e a cisticercose fazem parte de um complexo com características cosmopolitas e é endêmico nos países latino-americanos, asiáticos e africanos. (JUNIOR E BITTENCOURT, 2005).

Consequência do saneamento básico deficiente e de educação sanitária precária, as doenças do complexo teniose-cisticercose constituem uma das raras parasitoses passíveis de erradicação no mundo, como preconiza a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma vez que os métodos de controle são perfeitamente conhecidos e eficazes.

A cisticercose bovina tem grande expressão no setor pecuário pela significativa prevalência, sendo esta de em torno de 3% nos estados do Sul e Sudeste do país (DUTRA *et al.*, 2012). É responsável por gerar significativas perdas econômicas para os criadores devido a condenação de carcaças com a presença de cisticercos (UNGAR e GERMANO, 1992).

#### **2.1.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E BIOLÓGICOS**

O parasitismo em humanos, em geral, é ocasionado por um único exemplar sendo os vermes conhecidos por solitárias e o homem é o único hospedeiro definitivo dos vermes adultos.



A tênia da espécie *T. saginata* são helmintos pertencentes à Classe Cestoidea. São vermes achatados dorsoventralmente, bilateralmente simétricos, em forma de fita e de corpo segmentado.

Os parasitas na forma adulta são de cor geralmente amarelada ou branca. O corpo é constituído por cabeça ou escólex, colo ou pescoço e corpo ou estróbilo. É o segmento mais longo compreendendo centenas de anéis ou proglotes imaturos (aparelho genital insipiente), maduros (órgãos sexuais masculinos e femininos) e grávidos (útero com milhares de ovos) (REY, 2001).

A *T. saginata* apresenta 4 a 12 m de comprimento podendo chegar a 25 m, escólex globular com quatro ventosas e sem a presença de acúleos e suas proglotes geralmente saem pelo ânus de forma ativa e isolada entre as evacuações (MACHADO, 1999; JUNIOR E BITTENCOURT, 2005).



FIGURA 1: Foto de *Taenia saginata* evidenciando as ventosas e o rostro sem acúleos.  
FONTE: Centers for Disease Control and Prevention - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern.

Na fase adulta, habita o intestino delgado do homem, fixando-se na mucosa duodenal através das ventosas, onde pode viver até 30 anos (MACHADO, 1999).

Na sua forma de larva ou metacestódeo, o agente etiológico da cisticercose bovina é denominado *Cysticercus bovis*, afetando também os búfalos (MACHADO, 1999; JUNIOR E BITTENCOURT, 2005).

As larvas, dependendo do tecido parasitado, apresentam-se como vesículas translúcidas, ovóides ou alongadas e contém um líquido claro no qual está imerso o escólex invaginado.

Os ovos são esféricos ou ovóides e possuem uma membrana externa espessa e estriada transversalmente, chamado de embrióforo, que confere grande resistência às condições adversas do meio ambiente. Internamente está presente um embrião (oncosfera), o qual, uma vez na musculatura se transforma na larva, o agente causador da cisticercose. Popularmente os cisticercos presentes na carne são conhecidos por canjiquinha, pipoquinha ou bolha (JUNIOR E BITTENCOURT, 2005).

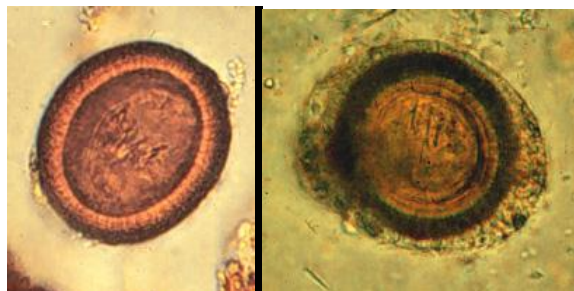


FIGURA 2: Ovos de *Taenia* sp. FONTE: University da Califórnia, São Francisco (UCSF).

Um único hospedeiro pode eliminar em torno de 500 mil a 700 mil ovos diariamente. A resistência dos ovos ao meio externo é bastante grande, permanecendo viáveis até um ano em ambiente com umidade relativa alta e durante meses em águas de esgoto e pastagem (MACHADO, 1999; REY, 2001).

O tempo decorrido desde a infecção pela ingestão de ovos até a formação do cisticerco corresponde aproximadamente 10 a 12 semanas.

A ingestão de carne bovina crua ou mal cozida contendo cisticercos vivos põe em liberdade os escólex que, sob ação dos sucos digestivos e após a sua desenvaginação, fixam-se à mucosa e completam o desenvolvimento no intestino (MACHADO, 1999).

### **2.1.2 CICLO BIOLÓGICO**

A contaminação do meio ambiente por fezes humanas é o fator determinante do ciclo biológico das espécies *T. saginata*. O gado se infecta com ovos presentes em fezes humanas existentes nas pastagens, água ou forragens. A contaminação indireta do pasto por dejetos mal processados e utilizados como adubos pode colaborar na disseminação dos ovos (MACHADO, 1999; REY, 2001).

Para o gado, a infestação se deve à única fonte, que é humana. A transmissão da cisticercose bovina pode ser direta ou indireta. A direta ocorre quando o homem estimula bezerros em confinamento por aleitamento artificial, colocando seus dedos ou material contaminado na boca do animal. Na indireta, as vias de transmissão abrangem a água, o solo e os alimentos (feno, silagem). Os vetores mecânicos e carreadores como besouros, baratas e aves apresentam importância epidemiológica variável conforme a região geográfica (MACHADO, 1999).

A dispersão dos ovos pelo meio hídrico pode atingir grandes distâncias pelas inundações ou pelo uso da água dos rios que recebem descargas de esgoto e dos próprios esgotos como fertilizantes de pastagens (MACHADO, 1999; REY, 2001; JUNIOR E BITTENCOURT, 2005).

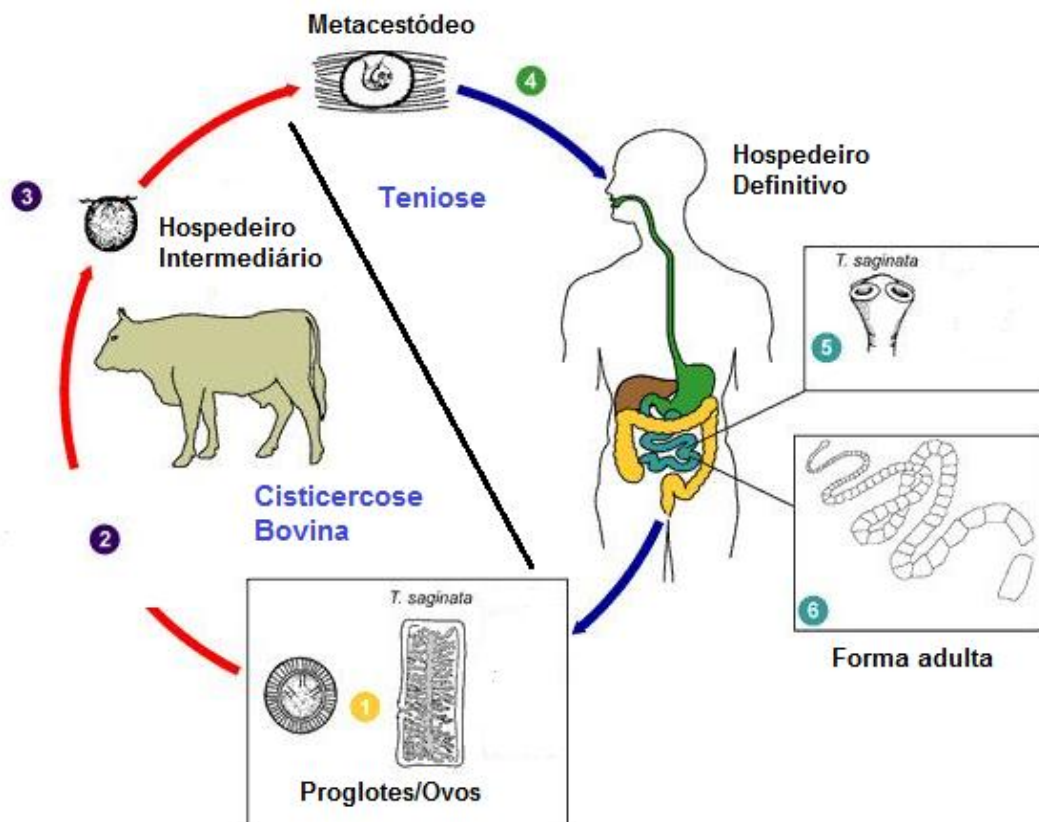


FIGURA 3: Ciclo biológico da *Taenia saginata*. 1: os ovos ou proglotes grávidas presentes nas fezes atingem o meio ambiente. 2: os bovinos e suínos são infectados pela ingestão de vegetação contaminada por ovos ou proglotes grávidas. 3: as oncosferas eclodem, penetram na parede intestinal e circulam até a musculatura. 4: os humanos infectam-se pela ingestão de carne crua ou mal passada. 5: o escólex se fixa no intestino. 6: parasitas adultos no intestino delgado. FONTE: Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern.

### 2.1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A teniose não é uma doença de notificação obrigatória, consequentemente a real prevalência não é conhecida. Em alguns países casos humanos de teniose tem sido estimados com base na venda de drogas cestocidas (ALLEPUZ, 2012).

Na década de 90, uma prevalência de 1,5% ou 75 milhões de pessoas infectadas pelas tenioses, com predomínio de *T. saginata*, sendo a maior parte nos países com baixo nível de desenvolvimento e de condições sanitárias da América Latina, Ásia e África. A ocorrência e a prevalência das infestações humanas por *T. saginata* estão relacionadas principalmente aos hábitos humanos de comer carne bovina crua ou mal cozida e não submetida à fiscalização sanitária (JUNIOR E BITTENCOURT, 2005).

Na Ásia, a teniose e a cisticercose são prevalentes na Índia, China, Indonésia, Tailândia, Coreia, Taiwan, Vietnã e Nepal e estão ligadas às práticas culturais, religiosas e baixas condições socioeconômicas. As áreas semi urbana ou urbana de Bali, no período de 2002 a 2004, apresentaram valores de teniose de 6,45% a 12,5% por exame de copro ELISA (WANDRA *et. al.*, 2006). A prevalência da teniose na Tailândia é de 0,6%. Entretanto alta prevalência de 5,9% foi encontrada em vilas do norte da província (WAIKAGUL, 2006).

Na África, com exceção dos países muçulmanos do norte e da África subsaariana, os demais são considerados endêmicos para ambas as doenças. Em Quênia a prevalência da teniose está estimada em torno de 2,5% (ASAAVA, 2009).

A Europa era endêmica para cisticercose no século XIX, com a doença ocorrendo em muitos países. Atualmente, em função da melhoria do padrão social da população, a doença praticamente desapareceu (MACHADO, 1999; JUNIOR E BITTENCOURT, 2005). Na Europa a prevalência da teniose varia entre 0,01% e 10%, sendo a Eslováquia e a Turquia os países com as maiores taxas (DORNY e PRAET, 2007).

No Brasil, o complexo teniose-cisticercose humano é endêmico em pelo menos 16 estados brasileiros e no Distrito Federal. Os resultados certamente não refletem a prevalência real, diante da pouca sensibilidade dos métodos de diagnóstico parasitológico utilizados na rotina laboratorial. Nem sempre os estudos utilizam técnicas de alta sensibilidade e especificidade, o que dificulta a avaliação mais precisa da real prevalência da doença (JUNIOR E BITTENCOURT, 2005).

No sul do Brasil, o Paraná é o estado onde mais se estuda o complexo teniose-cisticercose e onde as endemias são as mais diagnosticadas, confirmadas por estudos sorológicos, clínicos e tomográficos. Em Santa Catarina a cisticercose está incluída na lista das doenças com notificação obrigatória.

O perfil de doença essencialmente rural vem sendo modificado de forma acentuada, com muitos casos ocorrendo nas regiões urbanas, em decorrência dos intensos e constantes fluxos migratórios populacionais para essa área, nas quais os indivíduos infectados se transformam em importantes fontes de infecção e de disseminação da parasitose.

Em relação à cisticercose pela *T. saginata*, sua repercussão é no gado bovino e é causa de substanciais perdas econômicas. Os trabalhadores rurais são a fonte de infecção, pois, através de suas fezes contaminam as áreas de pastagem ou a água e alimentos ingeridos pelos animais (MACHADO, 1999; JUNIOR E BITTENCOURT, 2005; MS, 2008).

## **2.1.4 CONTROLE E PROFILAXIA**

As ações sanitárias para o controle das teníases devem basear-se primariamente em estudos da frequência e distribuição espécie-específica tanto do parasitismo humano como animal, e dos indicadores epidemiológicos tais como os índices de prevalência regionais.

Os serviços de vigilância não devem restringir-se à fiscalização em área urbana, mas implantar medidas de saneamento e de educação sanitária principalmente nas fazendas de criação de bovinos e suínos em manejo extensivo (MACHADO, 1999).

A proibição do abate clandestino e comercialização dos produtos deve ter legislação específica para os proprietários, comerciantes e industriais.

A principal medida sanitária e profilática à teníase é a inspeção em matadouros e frigoríficos garantindo a fiscalização da carne destinada ao consumo humano. A

presença de saneamento básico em geral e evitando-se o uso inadequado de resíduos fecais na fertilização de pastagens e plantações, a modernização do manejo na criação dos animais de forma confinada e higiênica e a educação sanitária com esclarecimento da população sobre a doença (JUNIOR E BITTENCOURT, 2005).

O bloqueio do foco de infecção é fundamental para o impedimento da disseminação da doença assim como fornecer o tratamento específico e orientações a respeito das medidas adequadas de higiene. O enfoque interligado das ações sanitárias e educativas em conjunto com as decisões políticas e econômicas podem contribuir para a implementação de programas globais e de erradicação das teníases mesmo a longo prazo (JUNIOR E BITTENCOURT, 2005)..

Em 1996 o Ministério da Saúde criou o projeto para o controle do complexo teniose-cisticercose no Brasil com o objetivo de conhecer a magnitude e a distribuição dos casos (MACHADO, 1999; JUNIOR E BITTENCOURT, 2005; EDDI *et. al.* MS, 2008).

### **2.1.5 ERRADICAÇÃO**

A erradicação da teniose está relacionada aos seguintes fatores:

- O ciclo requer humanos como hospedeiros definitivos que correspondem às únicas fontes de infecção para os hospedeiros intermediários.
- Existem outros reservatórios animais, até silvestres, mas somente os domésticos apresentam importância epidemiológica.
- As possibilidades de controle estão relacionadas à administração maciça de drogas antiparasitárias contra tenioses nos humanos e controle sanitário da infecção animal (MACHADO, 1999; JUNIOR E BITTENCOURT, 2005; EDDI *et. al.*, 2006; MS, 2008).

A intensificação da atividade agropecuarista, limitação da inspeção, popularidade crescente de alimentos à base de carne bovina mal cozida e instalações

inadequadas para eliminação de ovos em fezes, tem contribuído para um aumento da prevalência de *T. saginata*.

As principais dificuldades para o controle em curto prazo, na maioria das áreas endêmicas são:

- A inexistência de vigilância epidemiológica e controle das parasitoses por *Taenia*;
- Cooperação dos serviços médicos e veterinários nas zonas rurais;
- Ausência de medicamentos ovicidas. Para que a quimioterapia tenicida seja eficaz, ela deve ser acompanhada de campanhas de educação sanitária, melhora da higiene pessoal e infraestrutura sanitária (MACHADO, 1999).

## **2.2 CISTICERCOSE BOVINA**

Apesar de ser conhecido desde a antiguidade, o complexo teniose/cisticercose ainda representa um grande problema de saúde pública e é causa de prejuízos econômicos para a cadeia produtiva de carne. O impacto sócio-econômico que gera é significativo, tanto pela inaptidão temporária ou permanente que ocasiona em indivíduos em idade produtiva, quanto pelo seu alto custo em relação ao diagnóstico, tratamento e programas de controle das enfermidades (GIROTTI, 2008).

A bovinocultura de corte é a atividade que representa a maior fatia do agronegócio brasileiro. As exportações de carne bovina do Brasil somaram US\$ 5,769 bilhões em 2012, um aumento de 7,33% em relação a receita de US\$ 5,375 bilhões registrada em 2011. Os maiores mercados da carne bovina brasileira em faturamento no ano passado foram Rússia (19%), Hong Kong (14%), União Europeia (14%), Egito (10%); Venezuela (8%), Chile (7%), Irã (6%), Estados Unidos (3%), Arábia Saudita (3%) e Líbano (1%). Os dados foram compilados e divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2012).



A carne bovina é um produto cujo comércio está sujeito à determinação e imposição de normas e legislações técnicas e sanitárias específicas. O Brasil apresenta atualmente, unidades muito modernas que produzem carnes e derivados de alta qualidade. Contudo, questões sanitárias podem configurar-se como barreiras não tarifárias (BNT's), interferindo na comercialização do produto. Outro fator que pode contribuir com a queda na exportação, é a falta de rastreabilidade dos animais.

A cisticercose e tuberculose são algumas das principais zoonoses detectadas no exame *pós-mortem*, realizados pelo serviço de inspeção, que causam impactos tanto na qualidade quanto no aspecto econômico.

O conhecimento desta e outras doenças encontradas em bovinos abatidos em uma determinada região permitem a elaboração e adoção de medidas, inclusive de orientação a produtores e políticas públicas que visem à prevenção de zoonoses, com melhoria da sanidade do rebanho e conseqüentemente do produto final (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A faixa aceitável da prevalência da cisticercose bovina para um país em desenvolvimento gira em torno de 1 a 3% e quando esta faixa é ultrapassada, é necessário tomar medidas preventivas urgentes para controlar tal fato.

### **2.2.1 INSPEÇÃO SANITÁRIA DA CARÇA BOVINA**

O único método utilizado atualmente para a detecção da cisticercose bovina e suína na rotina dos abatedouros é a inspeção visual da carne chamado de método de “corta e olha”. Consiste em uma inspeção anatomopatológica criteriosa da carcaça do animal logo após o seu abate, realizada por pessoas treinadas como médicos veterinários. É obrigatória a sua realização desde 1952.



FIGURA 4: Foto de cisticerco presente em músculo bovino. FONTE: O autor.

O artigo 176 do decreto 30.691/52, que regulamenta a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), especifica quais são os órgãos a serem inspecionados rotineiramente no exame *post-mortem*. São eles: cabeça, músculos mastigadores, esôfago, língua, diafragma, coração e músculos peitorais (BRASIL, 1952).

Quando são encontrados cisticercos nas linhas de inspeção, as lesões são identificadas e as meias-carcaças, juntamente com as vísceras e cabeça, são encaminhadas para o Departamento de Inspeção Final (DIF) onde passam por exame pelo médico veterinário responsável, conforme procedimentos regulamentares.

É crescente o número de trabalhos científicos apontando que as regiões anatômicas nas quais os cisticercos podem se alojar não são necessariamente as avaliadas no exame *post-mortem* e que a inspeção visual pode não detectar os animais infectados sendo necessária a utilização de outras técnicas como exames sorológicos (DORNY *et. al.*, 2000; ALLEPUZ, 2012).

Os cisticercos têm uma predileção pelo coração em 53,67% dos casos e pelos músculos mastigadores (masseteres) em 43,79%, somando um total de 97,46% (LIMA

et. al., 2011) embora Soares e colaboradores (2011) tenham encontrado alta prevalência de cisticercos na região da paleta (14.37%), cabeça (11.21%), pescoço e acém (8.05%), coração (7.75%) e coxão mole (7.18%), totalizando 48.51% do número de cistos encontrados nos 24 cortes de carne analisados.

Os sítios normalmente descritos como de alta predileção pelo parasita como língua (3.12%), diafragma (1.69%) e o esôfago (1.60%) apresentaram baixa incidência de cistos.

O estudo mostrou que 71.42% das carcaças infectadas foram identificadas pela inspeção padrão de carne. Portanto, 28.58% das carcaças infectadas seriam liberadas para consumo humano como sendo livres de *C. bovis*.

Minozzo e colaboradores (2002) utilizaram 4 animais bovinos experimentalmente infectados por ovos de *Taenia saginata*. A distribuição anatômica nesses animais foi: coração (6,98%), diafragma (2,56%), pulmão (2,14%), fígado (1,71%), língua (1%), rim (0,43%), músculos anteriores (46%), músculos posteriores (35,33%) e cabeça (3,85%).

Lopes e colaboradores (2011) obtiveram baixa incidência de parasitismo no cérebro (0,01%), baço (0,02%), músculos da cauda (0,23%), rins (0,25%) e esôfago (0,34%). Alta incidência foi observada em paleta (12,55%), coração (11,02%), fígado (9,48%), músculos masseteres (8,51%), acém (8,25%), contra-filé (7,25%), patinho (6,63%), costela (5,54%) e coxão mole (5,29%).

A legislação brasileira prevê basicamente três destinos para a carcaça que está acometida com o *Cisticercus bovis*, a liberação, a condenação e aproveitamento condicional, através do tratamento pelo frio, salga e/ou calor, sendo que os maiores prejuízos econômicos ocorrem nos dois últimos tipos de destinações (Tabela 1). De modo geral, a condenação total é indicada para casos de infecções generalizadas. As carcaças que apresentarem infestação maciça de cisticercos serão totalmente reprovadas para consumo humano, sendo destinadas à elaboração de subprodutos como: gordura animal e ingredientes para ração animal (farinha de carne, sangue e ossos).

A liberação da carcaça *in natura* é prevista quando for encontrado um único cisto calcificado após sua excisão. Nos casos de infecções moderada ou localizada, as carcaças e órgãos afetados podem ser aproveitados, após serem submetidos a um dos tratamentos: pelo frio (-10 °C por 10-14 dias), pelo calor (à temperatura mínima de 60 °C) ou pela salga (à temperatura de 10 °C).

Para um abate mensal de 12.000 cabeças e um índice médio de 1,5% de carcaças congeladas, o prejuízo pode chegar a R\$ 232.000,00. Quando os cistos são encontrados na carcaça, ela é destinada a conserva (carne do tipo indústria, imprópria para consumo humano *in natura*), apresentando deságio de cerca de 65% (REHAGRO, 2013).

Os prejuízos ao produtor podem chegar a perda total da carcaça, descontos no valor da arroba que variam de 20% a 50%, de acordo com os critérios estabelecidos pelo frigorífico. É proibida a exportação e às vezes o desconto é de 100%, quando a carcaça vai para a graxaria (AGROLINK, 2013).

Se a carcaça é condenada ao tratamento pelo frio, o preço pago na arroba do boi é penalizado em 30%. Se destinada à conserva (esterilização pelo calor), o pecuarista recebe apenas 50% do valor do peso. Além disso, o matadouro também é prejudicado, pois não se consegue gerar valor agregado ao produto oriundo destas carcaças, uma vez que pode haver desvalorização de até 79% do preço vendido pela carne condenada à conserva comparada ao mesmo corte destinado à exportação (OLIVEIRA *et al*, 2010).

TABELA 1 : DESTINO DE CARCAÇAS COM CISTICERCOSE.

Quantidade	Tratamento	Destino
1 cisto calcificado	-	Carcaça liberada
1 cisto vivo	Tratamento pelo frio (1°C por 10 dias) ou tratamento alternativo (salga – 21 dias)	Carcaça liberada
2 cistos calcificados	Tratamento pelo frio ou tratamento alternativo	Carcaça liberada
+ de 3 cistos em cerca de um palmo de extensão	-	Carcaça bovina condenada. Carcaça suína condenada, mas é permitido o aproveitamento de tecidos adiposos para o fabrico da banha
1 cisto	-	EXPORTAÇÃO PROIBIDA

FONTE: RIISPOA (BRASIL, 1952).

## 2.2.2 PREVALÊNCIA DA CISTICERCOSE BOVINA

O conhecimento da prevalência da doença, tanto no homem quanto nos animais, é deficiente devido à falta de dados sistemáticos, fidedignos e comparáveis. O processamento e divulgação dos mesmos são deficientes, perdendo-se, assim, uma importante informação. As limitações sobre as informações da ocorrência da cisticercose bovina são, particularmente, verdadeiras no que se refere à América Latina.

A importância de se ter dados epidemiológicos está relacionada com a adoção de medidas de prevenção da teniose humana, através da destinação adequada de carcaças e órgãos bovinos com cisticercose. Também auxilia no fornecimento de dados estatísticos e nosogeográficos, função esta primordial dentro da vigilância sanitária. O diagnóstico da cisticercose, somado à informação de origem do animal, possibilita definir as áreas de ocorrência da doença, bem como a sua quantificação (UNGAR E GERMANO, 1992)

De acordo com dados europeus relacionados com a inspeção de carne, a prevalência da doença situa-se de 0.007% a 6.8%, mas a real prevalência é considerada como sendo pelo menos 10 vezes maior (CHIESA, 2010). Existe uma grande variação entre os países, regiões e abatedouros. A cisticercose bovina parece ser mais comum em países do leste europeu em comparação com os do norte, oeste e sul da Europa (DORNY e PRAET, 2007).

Dados de bovinos abatidos de todos os 27 estados brasileiros, totalizando 5514 municípios, durante o período de Janeiro/2007 a Abril/2010 foram obtidos através do banco de dados do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura e Abastecimento (SIF/MAPA) (DUTRA *et. al.*, 2012). Durante o estudo, a prevalência da cisticercose bovina no período analisado foi de 1.05%.

TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO E PREVALÊNCIA DA CISTICERCOSE BOVINA POR ESTADO DO BRASIL.

<b>Estado</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>Abril/2010</b>	<b>Total</b>
Acre	0/294.572	0/274.711	2/283.343	11/88.569	13/941.195 (0,001)
Amazonas	10/75.343	10/71.677	4/80.753	0/33.376	24/261.049 (0,01)
Pará	20/1.915.278	21/1.590.895	14/1.654.956	4/699.460	59/ 5.860.589 (0.001)
Rondônia	1.570/1.980.893	1.398/1.641.190	1.207/1.734.381	245/882.708	4.420/ 6.239.172 (0,07)
Tocantins	282/1.037.760	254/812.087	242/777.971	89/397.361	867/ 3.025.179 (0,02)
Alagoas	3/59.377	5/47.480	0/1.951	0/0	8/108.808 (0,01)
Bahia	250/412.792	2.015/367.369	1.031/325.751	250/125.786	3.546/ 1.231.696 (0,28)
Sergipe	40/45.140	79/40.151	78/40.817	9/17.599	206/ 143.707 (0,14)

Goiás	23.322/2.711.378	20.975/2.649.508	18.728/2.314.979	4.243/922.719	67.268/ 8.598.584 (0,78)
Mato Grosso	6.467/4.488.484	4.431/3.664.409	4.457/3.738.954	1.094/1.809.102	16.449/ 13.700.949 (0,12)
Mato Grosso do Sul	49.877/3.513.366	43.262/2.996.704	46.402/3.738.954	12.194/1.357.107	151.735/ 10.923.399 (1,34)
Espírito Santo	2.120/225.310	2.293/229.486	1.446/171.483	391/57.565	6.250/ 683.844 (0,91)
Minas Gerais	12.444/1.901.929	16.261/2.130.197	12.673/2.029.128	3.346/735.944	44.724/ 6.797.198 (0,65)
Rio de Janeiro	330/27.032	484/47.117	317/21.097	72/10.432	1,203/ 105.678 (1,13)
São Paulo	135.525/4.022.536	110.229/3.461.752	83.399/3.184.555	71.681/1.332.922	400.834/ 12.001.765 (3,34)
Paraná	31.042/1.095.811	29.477/977.426	27.335/803.329	6.192/345.904	94.046/ 3.222.470 (2,91)
Santa Catarina	3.577/104.375	3.241/100.073	3.351/97.810	651/39.028	10.820/ 341.286 (3,17)
Rio Grande do Sul	24.850/677,056	21.544/705.305	23.685/735.953	7.789/378.168	77.868/ 2.496.482 (3,12)

FONTE: DUTRA *et al.*, 2012.



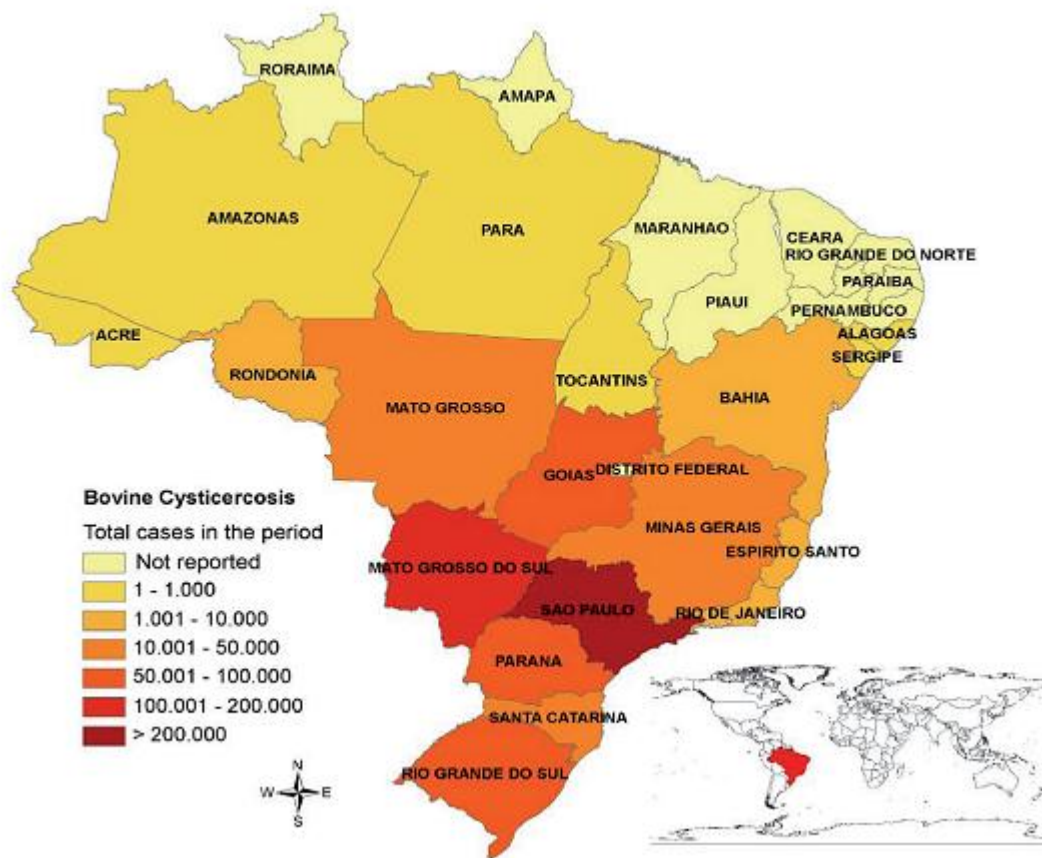


FIGURA 5: Mapa epidemiológico demonstrando a prevalência da cisticercose bovina em gados abatidos de acordo com os estados brasileiros durante o período de Janeiro/2007 a Abril/2010. FONTE: Dutra *et al.*, 2012

No Brasil a produção de bovinos é principalmente realizada através do sistema extensivo de produção em que os animais apresentam acesso livre às pastagens, podendo entrar em contato direto com águas contaminadas. Esse sistema de produção pode facilitar a disseminação da ocorrência de cisticercose bovina em algumas áreas do estudo independente das diferenças agroecológicas e socioculturais. Ainda, problemas associados com saúde pobre, infraestrutura inadequada, consciência de saúde pública baixa e descarte impróprio dos detritos são os principais fatores associados com a elevada prevalência de cisticercose em países em desenvolvimento.

Adicionalmente, taxas de infecção comparativamente altas na latitude inferior a 10° 00' 00" S, pode ser a manifestação de reduzida densidade populacional em áreas acima desta latitude devido à baixa concentração de reprodução de gado comercial e/ou o reduzido contato homem-animal. A elevada taxa de prevalência da doença em países do Sul e em São Paulo pode ser devido a maior quantidade de casos diagnosticados em relação aos outros estados, e não necessariamente a existência de mais casos.

O estudo desenvolvido por Dutra e colaboradores (2012) demonstrou uma redução (23%) no número de casos de cisticercose bovina de 2007 até 2009. Essa redução pode representar uma redução real da infecção ou pode ser a manifestação de inconsistência durante a inspeção visual de carcaças em frigoríficos, resultando em animais falsos negativos. Deve-se enfatizar que métodos padrões de inspeção de carne usados por veterinários do SIF, estão restringidos a cortes superficiais em sítios preferenciais do cisticerco e músculos facilmente acessíveis e pode não necessariamente fornecer dados confiáveis contribuindo para a subestimação da prevalência da doença.

### **2.2.3 RASTREABILIDADE BOVINA**

A implantação do sistema de rastreabilidade tornou-se obrigatório em julho de 2002 para exportação de carne bovina *in natura* para a União Européia e em março de 2004, para os demais destinos. Hoje, toda a carne exportada pelo Brasil deve ser rastreada.

O Sistema Brasileiro de Identificação e Certificação de Origem Bovina e Bubalina (SISBOV) tem como objetivo registrar e identificar o rebanho de bovinos e bubalinos do território nacional possibilitando o rastreamento do animal desde o nascimento até o abate, bem como o rastreamento do processo produtivo no âmbito das propriedades rurais.

O SISBOV estabelece regras e normas para o processo de rastreabilidade de bovinos e define o termo como sendo o conjunto de ações, medidas e procedimentos adotados para caracterizar e identificar a propriedade de origem, a identificação individual do animal (mês do nascimento ou data de ingresso na propriedade, sexo, sistema de criação e alimentação), todos os registros das movimentações e os dados sanitários. Esta rastreabilidade visa dar maior segurança ao alimento proveniente dessa exploração econômica

As informações coletadas pelo SISBOV colaboram para nortear a tomada de decisão quanto à qualidade do rebanho nacional e importado. No site do SISBOV está disponível uma lista das propriedades consideradas aptas a exportação de carne bovina para a União Européia.

A cisticercose é uma importante causa de condenação de órgãos e carcaças, gerando prejuízos econômicos significativos. Além disso, tem grande importância na saúde pública tendo em vista que o homem é o consumidor destes produtos cárneos. Sendo assim, é de extrema importância um programa de educação sanitária, assim como a inspeção sanitária de produtos de origem animal e o preciso diagnóstico dessa enfermidade a fim de prevenir e controlar a incidência dessa doença.

Para o diagnóstico da cisticercose bovina tem sido propostos exames sorológicos como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o *immunoblot utilizando tanto* antígenos brutos (OGUNREMI, BENJAMIN, 2010), como antígenos heterólogos (MINOZZO *et al.*, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2006; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2010) e peptídeos sintéticos (FERRER *et al.*, 2003; 2007; ABUSEIR *et al.*, 2007). Exames imunohistoquímicos e moleculares, como o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), foram avaliados para o diagnóstico da cisticercose (OGUNREMI *et al.*, 2004; CHIESA, 2010).

Portanto, em meio à baixa sensibilidade da avaliação pelo método “corta e olha”, o diagnóstico sorológico preciso da cisticercose exige o desenvolvimento biotecnológico de métodos sensíveis, que identifiquem animais parasitados, como por

exemplo, o uso de peptídeos sintéticos que mimetizem os epítomos (mimotopos) do *C. bovis* obtidos pela técnica do *Phage Display*.

## **2.3 PHAGE DISPLAY**

A técnica de *Phage Display* foi primeiramente introduzida em 1985 por (SMITH, 1985). Utilizando a tecnologia de recombinação de DNA padrão, o material genético de bacteriófagos é modificado de forma a incluir sequências codificantes de peptídeos de interesse associadas com DNAs virais em replicação (AZZAZY & HIGHSMITH, JR., 2002; SMITH & PETRENKO, 1997).

### **2.3.1 FAGOS FILAMENTOSOS**

#### **2.3.1.1 ESTRUTURA**

Fagos são vírus que infectam uma variedade de células bacterianas Gram-negativas utilizando pili como receptores. Muitos dos vetores utilizados são fagos que infectam o hospedeiro padrão de DNA recombinante, a bactéria *Escherichia coli*.

Fagos filamentosos consistem em bastões flexíveis de aproximadamente 1 µm de comprimento e 6 nm de diâmetro. O material genético está na forma de DNA de fita simples (DNA fs) ou RNA (HAQ *et al.*, 2012). O genoma completo do fago compreende 11 genes.

Um fago viável expressa em torno de 2700 cópias do gene de proteína 8 (g8p ou pVIII), uma proteína de 50 resíduos de aminoácidos conhecido também por proteína principal de capsídeo e de 3 a 5 cópias da proteína codificada pelo gene III (g3p ou pIII), uma proteína de 406 aa que consiste em uma das 3 proteínas menores da capa do fago filamentoso, na sua extremidade. Além da proteína g3p presente em uma das extremidades do fago, existem 5 cópias da pequena proteína de capa pVI, codificada pelo gene VI; as pequenas proteínas de capa pVII e pIX (genes VII e IX) estão

localizadas na outra extremidade (AZZAZY & HIGHSMITH, JR., 2002; SMITH & PETRENKO, 1997).

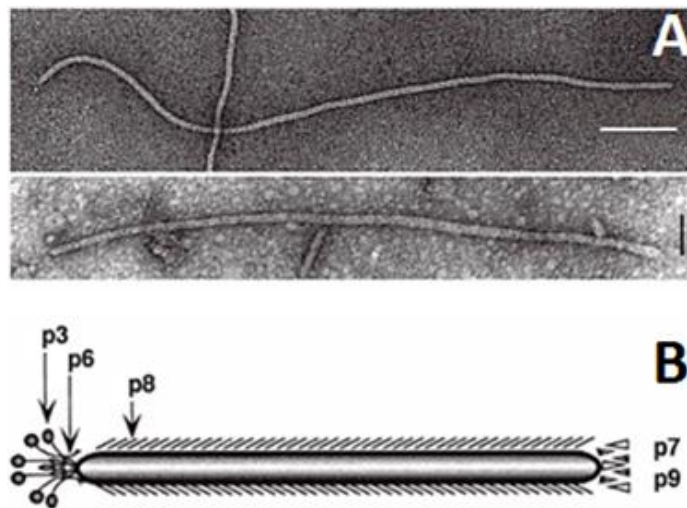


FIGURA 6: Estrutura do bacteriófago filamentosos (A). P3, P6, P8, P9 e P7 representam as proteínas estruturais do vírus (B). Geralmente, os peptídeos codificados pelo DNA exógeno, são expressos na P3 ou P8. FONTE: Adaptada de FAUQUET *et al.*, 2005.

### 2.3.1.2 BIBLIOTECA

Uma biblioteca de *Phage Display* é uma mistura heterogênea de clones de fagos, cada um carregando um inserto diferente de DNA e expondo um diferente peptídeo em sua superfície. Cada peptídeo da biblioteca pode replicar desde que o fago o qual o peptídeo está ligado consiga infectar uma célula hospedeira nova, multiplicando e gerando uma grande produção de progênie de fagos expondo o mesmo peptídeo (SMITH & PETRENKO, 1997).

O tipo mais comum de construções de *phage display* são bibliotecas de peptídeos aleatórias, consequência da estratégia de seleção de mimotopos (peptídeos selecionados semelhantes bioquimicamente ao epitopo original) sintéticos de Geysen e colaboradores desenvolvido em 1986 (GEYSEN *et al.*, 1986). Uma biblioteca aleatória típica de peptídeos apresenta em torno de um bilhão de clones de fagos.

#### **2.3.1.3 CICLO DE VIDA**

Fagos filamentosos não provocam uma infecção lítica em *E. coli* mas induzem um estado em que a bactéria infectada produz e secreta partículas de fagos sem sofrer lise. A infecção inicia-se pela ligação do domínio N-terminal g3p do fago ao pili F da bactéria. Ao longo do processo, as proteínas da capa dissolvem na superfície do envelope celular e o DNA fs sem revestimento entra no citoplasma. Apenas o DNA fs circular entra na bactéria onde é convertido pela maquinaria de replicação do hospedeiro na forma replicativa de cadeia dupla semelhante ao plasmídeo (FR). A FR passa por um processo para gerar DNA fs e também serve como molde para a expressão das proteínas do capsídeo do fago. A progênie do fago é montada através do encapsulamento do DNA fs em proteínas de capa e expulso através da membrana bacteriana para o meio. Progênies de vírions são secretadas continuamente sem matar o hospedeiro; as células cronicamente infectadas continuam a dividir, mas a uma taxa menor que as células não infectadas (AZZAZY & HIGHSMITH, JR., 2002).

#### **2.3.1.4 EXPOSIÇÃO DE PEPTÍDEOS EM FAGOS FILAMENTOSOS**

Peptídeos externos têm sido fusionados a três proteínas de capa: pIII, pVIII e pVI. Peptídeos de poucas centenas de resíduos em comprimento podem ser expostos

em pIII. Devido a natureza cristalina da proteína pVIII na superfície do vírus, ela tolera apenas pequenos (9-mer) peptídeos no seu N-terminal (KAY *et al.*, 2001).

### 2.3.2 SELEÇÃO

O processo de seleção consiste em escolher uma população de peptídeos expressos em fagos, de acordo com a sua afinidade por algum ligante, sendo este um anticorpo (HELL *et al.*, 2011), um receptor (MALCOR *et al.*, 2012), uma toxina (de MOURA *et al.*, 2011), entre outros. A subpopulação pode ser amplificada através da infecção de bactérias e submetida à nova seleção de forma a se aumentar a afinidade pelo ligante (KAY *et al.*, 2001; SMITH & PETRENKO, 1997).

Finalmente, os fagos capturados são clonados para que os peptídeos expostos responsáveis pela ligação possam ser estudados individualmente. A sequência de aminoácidos do peptídeo é facilmente obtida determinando a sequência codificante correspondente no DNA viral.

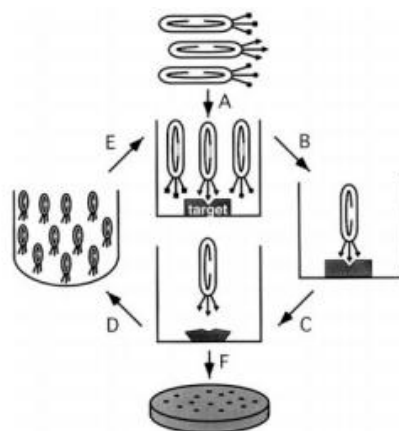


FIGURA 7: Esquema do Ciclo de Seleção ou Biopanning. No passo A, uma alíquota da biblioteca é colocada em contato com a molécula alvo. Após a incubação (passo B), os



fagos não ligados são lavados. Os fagos ligados são recuperados (passo C) por eluição ácida ou por competição. Os fagos amplificados passam por novo processo de seleção (passo E), para completar um ciclo de seleção por afinidade. Após mais três ciclos de seleção, os fagos são plaqueados (passo F) para que se obtenham fagos individuais (clones) para análises adicionais. FONTE: KAY *et al.*, 2001.

### **2.3.2.1 FORMAS DE SELEÇÃO DO PEPTÍDEO**

Há várias formas de seleção dos peptídeos apresentados na superfície dos fagos. A seleção por afinidade se utiliza das características bioquímicas que fazem do peptídeo um componente afim de uma molécula alvo como um receptor, por exemplo. O receptor é imobilizado em um suporte sólido e passa-se a mistura de fagos através do receptor imobilizado.

Os fagos que expõem peptídeos afins se ligam ao receptor enquanto os fagos irrelevantes são eliminados por lavagens adstringentes. Finalmente, os fagos ligados são eluídos em uma solução que desfaz a ligação do receptor-peptídeo. A eluição pode ser feita por agentes básicos ou ácidos, por proteases e por competição, em que se utiliza um ligante solúvel conhecido do receptor. Os fagos eluídos ainda são infectantes e propagam-se pela infecção de bactérias para que ocorra sua amplificação.

É evidente que a diversidade de receptores-alvo utilizada para selecionar peptídeos por afinidade a partir de bibliotecas de phage-display é muito grande. Engloba não apenas receptores convencionais como anticorpos e receptores de hormônios, mas também superfícies plásticas e órgãos inteiros (SMITH & PETRENKO, 1997).

Outra possibilidade seria a seleção das bibliotecas através da passagem por uma coluna em que se tem um antígeno de interesse imobilizado (SMITH & PETRENKO, 1997).

A técnica de seleção em que o antígeno está presente em uma solução supera problemas com alterações conformacionais que ocorrem com a ligação de antígenos em superfícies sólidas (SMITH & PETRENKO, 1997).

A seleção de fagos *in vivo* consiste da inoculação de fagos em animais, sendo posteriormente o tecido coletado e examinado para avaliar a ligação do fago em marcadores endoteliais específicos para determinado tecido (SMITH & PETRENKO, 1997).

### **2.3.3 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE PEPTÍDEOS SELECIONADOS POR PHAGE-DISPLAY**

Uma vez os peptídeos tenham sido isolados, eles podem fornecer informações úteis ao pesquisador e apresentar várias aplicações, como: a estrutura primária do peptídeo selecionado frequentemente assemelha-se a estrutura primária do ligante natural da proteína alvo; formas sintéticas do peptídeo selecionado pode antagonizar a interação entre proteínas específicas tanto *in vivo* como *in vitro*; ligantes peptídicos têm sido isolados para receptores de superfície celular que apresentam atividade agonista; e os peptídeos podem servir como sondas para a procura de medicamentos (KAY *et al.*, 2001).

Um exemplo de sucesso em relação ao uso da técnica, refere-se ao fato de 5 mimotopos terem sido usados em ELISA indireto de competição para analisar a concentração total de aflatoxina em amostras de alimentos experimentalmente (WANG *et al.*, 2013).

Em artigo recente, outra aplicação interessante foi dada à técnica de *phage display* em que se identificou o epítopo reconhecido pelo anticorpo anti A33 que reconhece a proteína integral de membrana do tipo II expressa no envelope extracelular do vírus vaccínia que é crítico para facilitar a sua disseminação célula a célula (HE *et al.*, 2012).

Como peptídeos podem atuar como agonistas ou antagonistas de receptores ou modular o efeito biológico do receptor (KAY *et al.*, 2001; SMITH & PETRENKO, 1997), recentemente um peptídeo foi identificado por phage display como ligante do receptor de lipoproteína de baixa densidade, alvo para a entrega de medicamentos ao Sistema Nervoso Central (MALCOR *et al.*, 2012). Em outro estudo, antagonistas peptídicos bicíclicos da calicreína plasmática humana foram obtidos e demonstraram ser capazes de resistir a ação de proteases intestinais, fator importante a ser considerado na administração de medicamentos (BAERISWYL & HEINIS, 2013).

Em relação a doenças autoimunes, peptídeos que neutralizam imunoglobulinas estão sendo empregados como agentes terapêuticos (AZZAZY & HIGHSMITH, JR., 2002).

Moléculas direcionadas contra o sítio ativo das caspases tem sido o alvo do descobrimento de drogas. Usando o phage display para descobrir moléculas que se ligam a forma de zimogênio da caspase, conseguiram identificar um peptídeo que prejudica a função da caspase-6 *in vitro* e em células neuronais. Esses dados podem ser direcionados ao descobrimento de drogas que auxiliem nas doenças neurodegenerativas (STANGER *et al.*, 2012).

A principal aplicação de peptídeos miméticos, selecionados por phage display, na área da imunologia surge da sua capacidade de gerar anticorpos anti-peptídeo que reconhecem a proteína original (de Moura *et al.*, 2011) e que, portanto, podem ser utilizados em imunodiagnósticos bem como no desenvolvimento de vacinas (Capelli-Peixoto *et al.*, 2011).

Essa propriedade é baseada no reconhecimento de peptídeos por anticorpos utilizados como moléculas-alvo. Esses peptídeos podem ser idênticos ou semelhantes bioquimicamente aos epítomos de proteínas, os quais podem ser contínuos/lineares ou descontínuos, dependendo se os resíduos de aminoácidos participantes do epítopo são ou não contíguos na cadeia polipeptídica (VAN REGENMORTEL, 2001).

Anticorpos específicos para epítomos contínuos de antígenos protéicos tipicamente tem contato com 3 a 4 aminoácidos críticos de um segmento de 6 resíduos.

Em muitos contextos de pesquisa científica, é altamente desejável mapear o epítomo de uma determinada porção da proteína natural.

Pesquisadores mapearam com sucesso, o epítomo descontínuo da H-ferritina humana usando uma biblioteca de fagos com peptídeos contendo cisteínas (LUZZAGO *et al.*, 1993) para identificar a sua estrutura e conhecer a interação desta molécula com os anticorpos utilizados para selecionar os peptídeos.

Na maioria das vezes, os peptídeos selecionados são semelhantes bioquimicamente ao epítomo original, características que os faz serem denominados de mimotopos. O termo mimotopo foi sugerido em artigo publicado por Geysen e colaboradores (1986) e foi originalmente definido como um peptídeo capaz de ligar-se ao paratopo, local em que ocorre a ligação com o antígeno, de um anticorpo, mas não relacionado em sequência com o antígeno protéico usado para induzir o anticorpo. Em outras palavras, refere-se a pequenos peptídeos que se ligam especificamente a um sítio de ligação de um receptor, mimetizando o epítomo do ligante natural, sem combinar a sequência de aminoácidos do epítomo natural (VAN REGENMORTEL, 2001).

Para classificar como verdadeiro mimotopo, o peptídeo deve não apenas ligar-se ao anticorpo, mas também ser capaz de gerar anticorpos que reconheçam o epítomo sendo mimetizado (VAN REGENMORTEL, 2001).

MEOLA *et al.*, (1995) descreveram a indução de resposta imune humoral por mimotopos de antígeno de superfície do vírus de hepatite B humano podendo ser um bom candidato para vacinas.

Pesquisadores demonstraram experimentalmente a neutralização de atividades tóxicas de veneno de aranha marrom por mimotopos de peptídeos e encorajam a utilização destes imunógenos sintéticos na produção de soros terapêuticos e/ou vacinas (de MOURA *et al.*, 2011).

Seguindo essa mesma linha, pesquisadores isolaram o mimotopo NC-1 proveniente de *phage display* utilizando cisticerco de *Taenia solium* que pode ajudar a identificar pacientes com neurocisticercose através de imunoensaio (HELL *et al.*, 2009). A capacidade deste peptídeo em induzir anticorpos de proteção que reagem com as proteínas do tegumento do metacestódeo sugerem que este mimotopo é um candidato potencial para vacina contra cisticercose humana e animal e que a resposta imunológica protetora contra parasitas pode ser induzida por peptídeo sintético imunoselecionado por anticorpos específicos (CAPELLI-PEIXOTO *et al.*, 2011).

A base do descobrimento de epítomos é o mimetismo antigênico e imunogênico e constitui a nova abordagem para o desenvolvimento de vacinas e diagnóstico de doenças. Os mímicos imunogênicos podem ser usados como componentes de vacinas sintéticas.

O desenvolvimento de vacinas baseadas em peptídeos requer que os anticorpos induzidos neutralizem o agente infeccioso e protejam o hospedeiro contra a infecção específica (SMITH & PETRENKO, 1997; VAN REGENMORTEL, 2001).

Pequenos segmentos de diferentes proteínas expressas em partículas de vírus M13 foram usados para produzir anticorpos contra proteínas de superfície de parasitas e vírus (AZZAZY & HIGHSMITH, JR., 2002).

Peptídeos mímicos de lipopolissacarídeos (LPS) foram identificados e foram capazes de ligar-se aos receptores Toll do tipo 4 (TLR-4) importantes para desencadear uma resposta imune específica e, portanto, podem ser usados como adjuvantes em vacinas (SHANMUGAM *et al.*, 2012).

Ainda, para demonstrar a importância de mimotopos no desenvolvimento de vacinas, clones de fagos da cathepsina L da *Fasciola hepática* foram usados na vacinação de camundongos, os quais apresentaram alto título de anticorpos anti-mimotopos e a atividade proteolítica no tecido hepático foi reduzida após a imunização (VILLA-MANCERA *et al.*, 2011).

Em relação a doenças crônicas não transmissíveis como o câncer, os mimotopos de antígenos tumorais têm sido estudados na alteração da apresentação de antígenos e/ou na ativação de linfócitos T para aumentarem a expansão de células T específicas para o tumor (BUHRMAN & SLANSKY, 2013). A vacinação com peptídeos mímicos da proteína mucina do tipo 1 humana, responsável por aumento da invasão celular e pelo desenvolvimento de metástases, mostrou-se útil na prevenção de metástases em tumores que apresentam aumento dos níveis dessa proteína (JAMES & BOND, 2012).

Os mimotopos também podem ser usados como sondas específicas para anticorpos presentes em determinadas doenças. Os peptídeos fornecem alta sensibilidade em ensaios de diagnóstico porque permitem a amplificação do sinal após a ligação inicial do anticorpo ao antígeno alvo. Recentemente, um peptídeo para o diagnóstico de infecções por *Paracoccidioides brasiliensis* foi obtido através da seleção por *phage display* (CALDINI *et al.*, 2012). Outro exemplo da empregabilidade de mimotopos foi a utilização de um peptídeo capaz de discriminar pacientes com tumor de mama e pacientes saudáveis (HEO *et al.*, 2013).

Estudos em que peptídeos obtidos por *phage display* são selecionados com anticorpos mostram que o imunodiagnóstico de doenças parasitárias baseado em peptídeos pode ser alcançado (MANOUTCHARIAN, 1999; HELL *et al.*, 2009, GUO *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2010; CAPELLI-PEIXOTO *et al.*, 2011). Esses dados foram um incentivo ao desenvolvimento desse trabalho, pois trata-se do primeiro estudo a identificar e caracterizar a antigenicidade de mimotopos de *Taenia saginata* visando sua empregabilidade em um ensaio sorológico capaz de identificar animais parasitados

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar e caracterizar a antigenicidade de mimotopos de *Taenia saginata* frente a soros de bovinos positivos para cisticercose visando identificar animais infectados.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

1. Identificar sequências miméticas de antígenos de *Taenia saginata* amplificando phagos previamente selecionados pela técnica de Phage Display .
2. Obtenção e estudo das sequências aminoacídicas das sequências obtidas e comparação ao banco de dados.
3. Avaliar a antigenicidade, por ELISA indireto, dos mimotopos comparando-os ao antígeno bruto de *C. bovis*.
4. Avaliar por ELISA de competição, a especificidade dos mimomotos e do antígeno bruto frente ao soro de bovinos com altos títulos de anticorpos.
5. Identificar os aminoácidos essenciais para o reconhecimento dos anticorpos, pela técnica do *ALA scan* (Spot synthesis).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 PREPARO DO ANTÍGENO

Metacestódeos (larvas) de *Taenia saginata* foram usados como fonte do antígeno. Os metacestódeos foram coletados e dissecados de músculo esquelético de bovinos. Após a remoção da cápsula externa, os escólex foram triturados em cadinho contendo PBS gelado em pH 7.4 e inibidores de proteases, e submetidos a 5 ciclos de sonicação (40 Hz, 10 seg) em gelo. Após a centrifugação (7500 x g, 5 min, 4°C), a concentração protéica do sobrenadante foi determinada e as amostras foram armazenadas a -20°C.

### 4.2 SORO ANTI-METACESTÓDEO DE *TAENIA SAGINATA*

Os soros provenientes dos animais foram submetidos ao teste de ELISA indireto pela utilização de antígeno bruto de metacestódeo de *T. saginata* (TsCa) de acordo com estudos prévios (MINOZZO *et. al.*, 2004; THOMAZ-SOCCOL *et. al.*, 2011).

Placas para microtitulação com 96 poços achatados foram sensibilizadas *overnight* com 10 µg/mL of TsCa diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0.05M, pH 9.6. Após lavagens com solução salina em 0.05% de Tween 20, a placa foi bloqueada (2% caseína em tampão fosfato salino (PBS) 0,05, pH 7.4) por 1h a 37°C. Subsequentemente, as amostras de soro teste, diluídas a 1:100 em tampão de incubação (0.25% caseína, 0.05% Tween 20, PBS) foram adicionadas aos poços. Após a incubação e as lavagens, IgG anti-bovino, desenvolvido em coelho e ligado a *horseradish peroxidase* (HRP), foi diluído em tampão de incubação e adicionado aos poços (1:7,500). Seguindo incubação e lavagem, a reação foi revelada com solução de ortofenilenodiamina (0.2 mg/mL em tampão citrato 0.5 M, pH 5.2 e 0.02% peróxido de



hidrogênio). Após 15 minutos, a reação enzimática foi encerrada com 20  $\mu$ L de ácido sulfúrico a 2N e a absorbância foi mensurada a 490 nm (Figura 8). O valor de *cut-off* foi calculado como sendo a média de 5 soros negativos somado a três desvios padrão. Cada soro negativo foi obtido de animais cuja carcaça foi minuciosamente analisada.

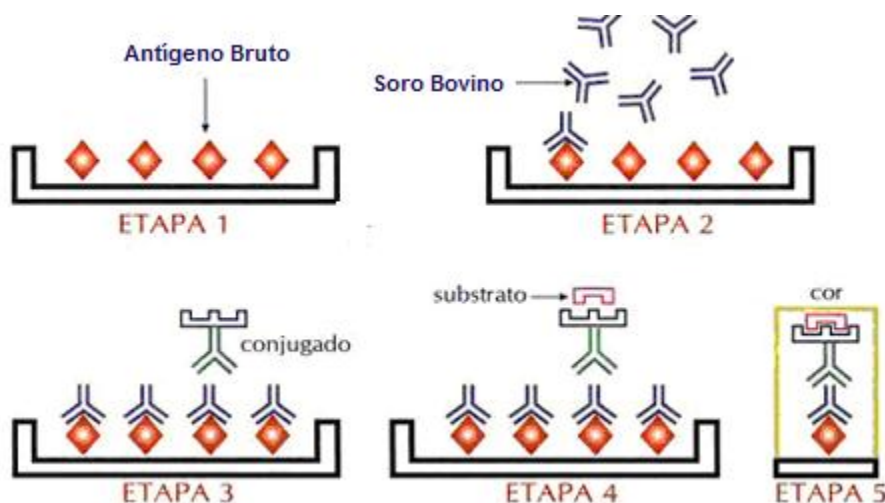


FIGURA 8: Esquema representativo do ensaio de ELISA utilizado para seleção de soros bovinos positivos para cisticercose.

#### 4.3 PREPARO DE IMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS

As imunoglobulinas específicas derivadas do soro foram obtidas com base nos procedimentos descritos por Hell *et al.* (2009) com modificações. Foi feito um *pool* com os soros de 120 bovinos sorologicamente positivos para TsCa e com alta titulação. Esses soros foram tratados com sulfato de amônio a 50% de saturação. Após centrifugação (2160 x g, 5 mn, a 4°C), o *pellet* foi ressuspendido e dialisado com 50 - 100 volumes of PBS pH 7.4.

Após esse procedimento, a fração de imunoglobulina G total foi purificada de acordo com a reatividade ao TsCa. Para isso, 1 mg TsCa foi corrido em câmara de eletroforese e transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio (PBS, 0.3% Tween 20), a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com 1 mg de IgG total diluída em PBS contendo 0.05% Tween 20 (PBS-T). A seguir, lavagens foram realizadas e as IgG específicas ligadas foram eluídas com glicina 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 2.8 e neutralizadas com Tris/HCl 1M, pH 9.0. A seguir, foi feita a diálise com PBS 0.05M e a concentração de IgG específicas foi determinada pela mensuração da absorbância da amostra a 280 nm.

#### 4.4 IMMUNOSCREENING DAS BIBLIOTECAS DE PHAGE DISPLAY

Cinco ciclos de biopanning foram realizados através da incubação de 4 bibliotecas aleatórias de fagos, cortesia de Dr. J. Scott (Universidade de Simon Fraser, Burnaby, Canadá), que expressam peptídeos de 8-mer (LX<sub>4</sub>), 15-mer (X<sub>15</sub>), 12-mer (XCX<sub>8</sub>CX) and 17-mer (X<sub>8</sub>CX<sub>8</sub>) (BONNYCASTLE *et al.*, 1996) com IgG de bovinos específicas. Para isso, no primeiro panning, um imunotubo (Nunc) foi sensibilizado *overnight* a 4°C com 5 µg/ml de IgG bovina anti *T. saginata* IgG diluída em 1,5 ml de tampão carbonato (100mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6). No segundo panning, 1 µg/ml de IgG bovina anti *T. saginata* foi usada para sensibilizar a placa e 0,5 µg/mL nos pannings subsequentes. Após lavagem com TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 e 0.05% Tween 20) e bloqueio (TBS-T e 3% BSA 3%), 1 x 10<sup>11</sup> ou 1 x 10<sup>12</sup> TU (unidades de transdução) de cada biblioteca diluída em 1,5 ml TBS-T foram adicionadas ao imunotubo e incubadas *overnight* a 4° C. Fagos não ligados foram removidos após intensa lavagem. Peptídeos de phage display selecionados por afinidade foram obtidos por competição após incubação (temperatura ambiente, 90 min) com TsCa em concentração 100 vezes maior que a IgG bovina. Após, os fagos eluídos foram clonados através da infecção em células da bactéria *Escherichia coli* K91.

#### 4.5 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE BIOPANNINGS E SCREENING DE PEPTÍDEOS DE PHAGE DISPLAY

Para analisar o enriquecimento dos pannings, uma placa de microtitulação de 96 poços foi sensibilizada com 10 µg/ml de IgG bovina anti *T. saginata*, lavada e bloqueada como descrito anteriormente. Sobrenadante bacteriano contendo partículas de fagos de cada biopanning, fagos selvagens (controle negativo) diluídos a 1:2 em tampão de incubação ou 10<sup>10</sup> TU de clones de fagos individuais foram adicionados em cada poço. Após incubação por 2 h a 37°C e lavagem, a reação foi detectada após a adição de anticorpos IgG anti-M13 conjugado a peroxidase (Figura 9). Clones que apresentaram reatividade pelo menos 2 vezes maior que o controle negativo foram selecionados e sequenciados utilizando o primer 5'-TCG GCA AGC TCT TTT AGG-3'.

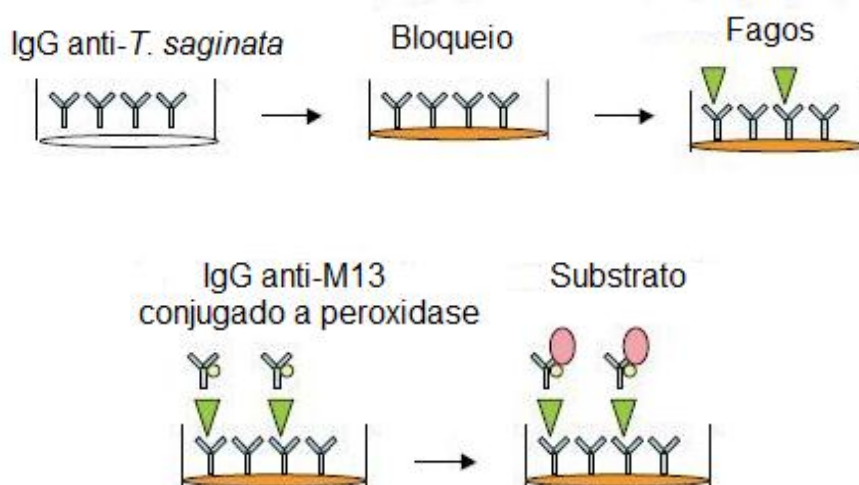


FIGURA 9: Esquema representativo do ensaio de ELISA utilizado para avaliar o enriquecimento dos biopannings.

#### 4.6 ELISA INDIRETO PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS

Foi realizado um teste de ELISA indireto para avaliar a antigenicidade dos peptídeos obtidos por *phage display*, conforme descrito acima. Placas de microtitulação foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com  $10^{11}$ ,  $10^{10}$ , e  $10^9$  TU/ml de peptídeos de phage display ou fago selvagem ou 10 µg/ml de TsCa. Após bloqueio e lavagens, soros positivos e negativos diluídos a 1:100 foram adicionados. A ligação dos anticorpos foi revelada pela incubação de IgG bovina desenvolvida em coelho conjugada a peroxidase (1:7.500). Os valores da absorbância foram determinados a 490 nm. Todas as mensurações foram efetuadas em triplicatas (Figura 10).

Similarmente ao procedimento descrito acima, 24 soros bovinos foram testados com 10 µg/ml de TsCa e  $10^{10}$  TU/ml de cada um dos 8 mimotopos expressos nos fagos com o objetivo de verificar se o uso de fagos (Tsag 1 - Tsag 8) imobilizados nos poços da placa irão gerar resultados similares aos obtidos através da utilização de TsCa como antígeno.

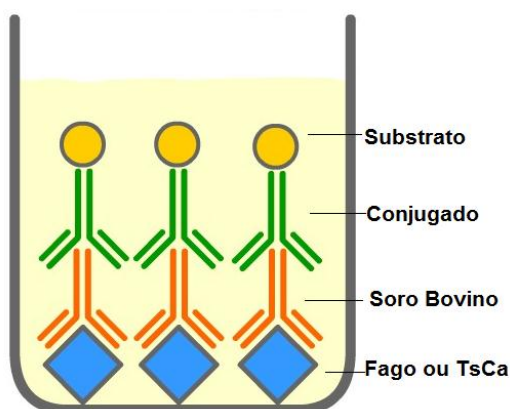
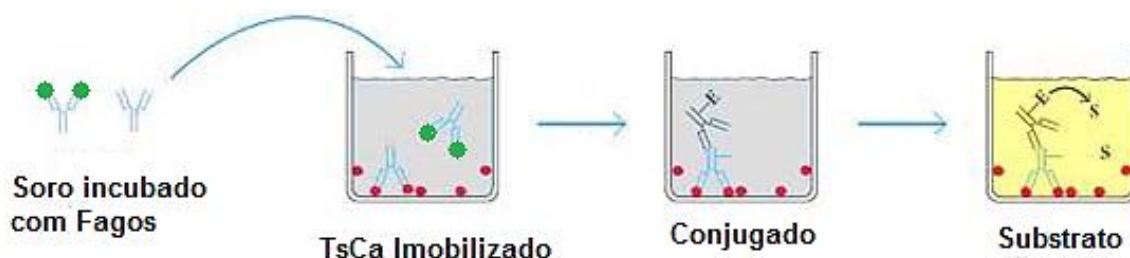


FIGURA 10: Esquema representativo do ensaio de ELISA utilizado para avaliar a antigenicidade dos peptídeos selecionados por *phage display*.

## 4.7 ENSAIOS DE COMPETIÇÃO

No primeiro ELISA de competição (Figura 10A) realizado, a microplaca de 96 poços foi sensibilizada com TsCa na concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$ , *overnight* a 4°C. A seguir, 10<sup>11</sup> TU/ml de fagos com os peptídeos expressos em sua superfície, um *pool* desses fagos ou fago silvestre foram incubados com soro bovino positivo na diluição de 1:600 e deixados *overnight* a 4°C. A microplaca foi lavada e colocou-se a solução de fagos incubada com o soro bovino. Após incubação e lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase. O ensaio foi revelado por solução de OPD, ácido cítrico e peróxido de hidrogênio (Figura 11 A). Os valores da absorbância foram determinados a 490 nm. Todas as mensurações foram efetuadas em triplicatas.

A



B

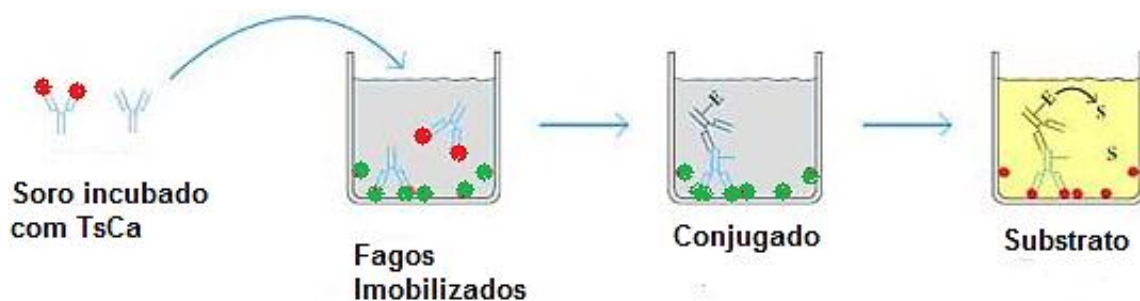


FIGURA 11 Esquema representativo do ensaio de ELISA de competição. A: ensaio de competição com TsCa imobilizado na placa competindo com os fagos. B: ensaio de

competição com fagos imobilizados na placa competindo com diferentes concentrações de antígeno bruto.

O segundo ensaio de competição de ELISA, a microplaca de 96 poços foi sensibilizada com cada um dos diferentes fagos de interesse, *pool* de fagos ou fago silvestre na concentração de  $10^{11}$  TU/ml. Soro bovino positivo na diluição de 1:600 foi incubado com antígeno bruto nas seguintes concentrações: 10 µg/ml, 100 µg/ml e 500 µg/ml, *overnight* a 4°C. No dia seguinte, após lavagens e bloqueio da microplaca, colocou-se a solução de fagos incubada com o soro bovino. A seguir após lavagens, foi adicionado o conjugado. A revelação foi efetuada por uma solução de OPD, ácido cítrico e peróxido de hidrogênio. Os valores da absorbância foram determinados a 490 nm. Todas as mensurações foram efetuadas em triplicatas.

#### 4.8 SPOT SÍNTESE E ALA SCANNING

Peptídeos sintéticos correspondentes a cada um dos peptídeos expressos nos fagos e seus análogos com a substituição por Ala (Ala scanning) foram preparados em uma membrana pela técnica de Spot descrita por Laune e colaboradores (2002). Sítios de ligação não específicos foram bloqueados através da incubação com 0.1% TBS-T e 3% BSA *overnight* a 4°C. A membrana foi sondada com um *pool* de soro bovino negativo ou positivo diluído a 1:2000 por 90 min a temperatura ambiente. Após lavagem, a ligação do anticorpo foi revelada pela incubação com anti-IgG bovina desenvolvida em coelho conjugada a peroxidase (1:30.000) e por detecção através de ECL. A intensidade de sinal (ImageJ) foram obtidas após a comparação com o *spot* de maior valor de pixel considerado como 100%.

#### **4.9 ANÁLISE *IN SILICO***

Os programas Blast e Clustal Omega foram utilizados para identificar, dentre as sequencias de proteínas já descritas em banco de dados, similaridades com as sequencias dos mimotopos descritos neste trabalho.

Foram consideradas as proteínas que apresentaram sequencia de no mínimo 4 aminoácidos iguais, com ou sem aminoácidos semelhantes em sua proximidade.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 IMUNOSELEÇÃO DE SOROS POSITIVOS PARA CISTICERCOSE POR ELISA INDIRETO

De um total de 1057 soros bovinos testados para TsCa, 120 foram selecionados de acordo com o alto título verificado por ELISA. Os soros considerados positivos apresentaram absorbância de pelo menos três vezes superior ao cut-off.

### 5.2 ENRIQUECIMENTO DE FAGOS LIGANTES DE ANTICORPOS ANTI TSca E ANÁLISE DE REATIVIDADE

A figura 8 ilustra o enriquecimento de fagos ligantes de anticorpos anti Tsca de acordo com 5 ciclos de pannings ou seleção (PI, PII, PIII, PIV e PV) e a reatividade de cada pool em relação aos anticorpos anti TsCa subtraindo o sinal de *background* proveniente do fago tipo selvagem. Embora a titulação de fagos tenha reduzido entre o quarto e quinto ciclos, a reatividade dos fagos eluídos após o quinto panning foi três ordens maior do que a absorbância dos fagos eluídos após o quarto ciclo. Após o quinto ciclo de seleção, o *pool* de fagos foi plaqueado, as placas foram escolhidas, clonadas e sequenciadas.



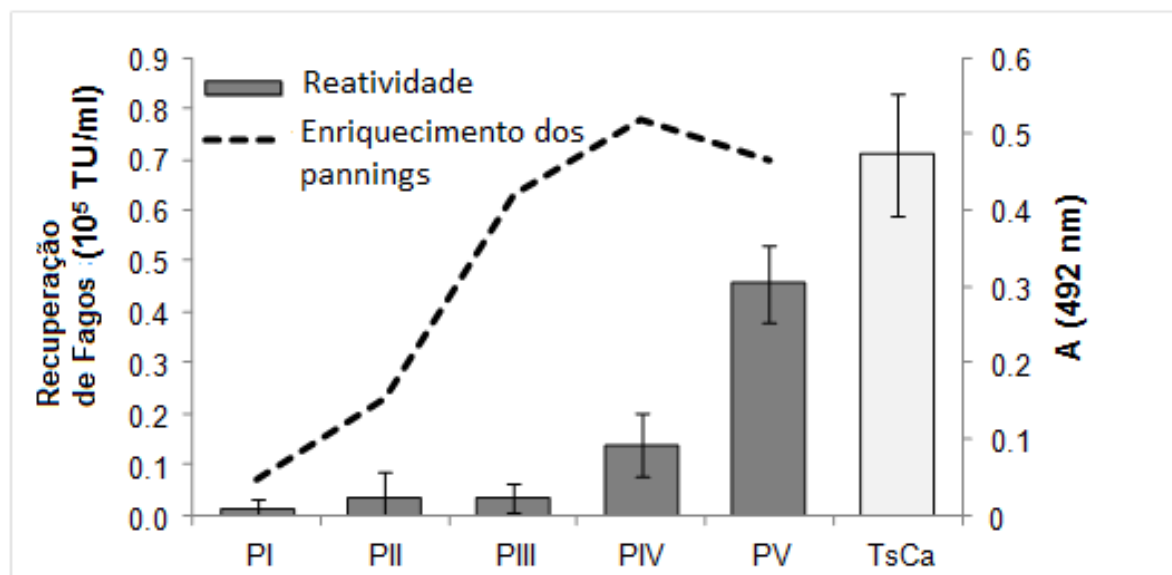


GRÁFICO 1. Enriquecimento e reatividade dos peptídeos obtidos por phage display selecionados por anticorpos anti antígeno bruto de metacetódeo de *T. saginata* após 5 ciclos de seleção. O número de partículas de fagos recuperadas após cada panning (PI, PII, PIII, PIV e PV) e sua reatividade contra anticorpo anti TsCa estão representados em unidades de transdução (TU) e em absorvância (492 nm), respectivamente. Antígeno bruto de metacetódeo de *T. saginata* foi usado como controle. Os valores de absorvância de cada panning foram subtraídos pelo background usando o sinal mediano do fago selvagem obtido de 3 ensaios repetidos.

### 5.3 PREVALÊNCIA DAS SEQUENCIAS DE MIMOTOPOS DE *T. SAGINATA*

Vinte e quatro fagos que apresentaram peptídeos com alta antigenicidade foram selecionados e sequenciados (Tabela 3). Apesar da biblioteca de 8-mer não apresentar representantes e a biblioteca de 15-mer ser a mais selecionada, as bibliotecas de 12- e 17-mer apresentaram a mesma frequência.

A sequencia mais prevalente, nomeada Tsag 1, foi obtida de 15 clones de fagos dentre os 24 clones selecionados enquanto a segunda mais prevalente, Tsag 5 foi encontrada apenas 3 vezes. Interessantemente ambas pertencem à biblioteca de 15-mer.

Conforme esperado, pares de cisteínas capazes de formar ponte dissulfeto foram encontrados apenas na biblioteca de 12-mer, uma biblioteca de peptídeo de construção por ponte dissulfeto.

De acordo com a análise de mimotopos, nenhuma sequencia consenso foi identificada, isto é, a ocorrência de um pedaço de sequencia de aminoácidos que seja igual ou semelhante, mas 7 de 8 peptídeos expostos por fagos apresentaram os três resíduos de aminoácidos mais frequentes, Prolina (n=13), Alanina (n=12) e Treonina (n=11). Também evidenciado em negrito e fontes maiúsculas (Tabela 3), a Arginina repetiu nas sequencias (n=11) em pelo menos duas vezes estando presente em 5 de 8 mimotopos. Embora Glutamina esteja presente em todas as sequencias, ela apareceu apenas nove vezes (Tabela 1, Letras sublinhadas).

TABELA 3 . SEQUENCIA, PREVALÊNCIA E RESÍDUOS MAIS FREQUENTES DE MIMOTOPOS OBTIDOS POR PHAGE-DISPLAY.

Resíduo de			
Clone	Amino ácido (n)	Prevalência	Sequencia
Tsag 1	15	15/24	HFY <u>Q</u> ITWLPNT <b>F</b> PAR
Tsag 2	12	1/24	<b>T</b> CIW <u>Q</u> WPDW <b>A</b> CK
Tsag 3	17	1/24	VH <b>T</b> Si <b>R</b> PRC <u>Q</u> PRA <b>I</b> TPR

Tsag 4	17	1/24	MGIR <b>ALPP</b> CQ <b>NA</b> RQ <b>RLS</b>
Tsag 5	15	3/24	LS <b>TH</b> TKLNK <b>ADI</b> Q <b>MP</b>
Tsag 6	15	1/24	Y <b>RW</b> P <b>STP</b> S <b>AS</b> RQ <b>ATL</b>
Tsag 7	15	1/24	G <b>AAR</b> HCQ <b>PAS</b> PATMM
Tsag 8	12	1/24	FCMST <b>CS</b> GLKCQ

#### 5.4 COMPARAÇÃO ENTRE A ANTIGENICIDADE DE TSQA E MIMOTOPOS OBTIDOS POR PHAGE DISPLAY

Tomando em consideração o antígeno bruto de *T. saginata* usado no diagnóstico da cisticercose, nós comparamos a antigenicidade dos mimotopos em relação ao TsCa, isto é, se os peptídeos expostos nos fagos podem ser utilizados tão eficientemente quando o TsCa em um método de ELISA. Para este fim, 24 soros bovinos foram testados e 19 deles foram positivos (Figura 2 - A, B, C) enquanto 5 soros foram considerados negativos usando TsCa como antígeno (Figura 2 - D).

Embora Tsag 1 tenha sido o mais prevalente fago na seleção, ele identificou apenas 11 soros como positivos (Figura 9 – A, B, C) e 4 resultados negativos (Figura 9 - D) de acordo com os resultados obtidos pelo antígeno TsCa, esse fato pode ser parcialmente explicado pelo seu alto valor de cut-off (0,436). Resultados similares foram obtidos com Tsag 4 e Tsag 6, mas com valores menores de cut-off.

Apesar de Tsag 5 tenha sido o segundo fago mais prevalente, ele apresentou resultados discordantes em relação os soros negativos, isto é, 4 de 5 soros considerados negativos usando o TsCa como antígeno, apresentaram resultados positivos com Tsag 5 (Figura 9 - D). Por outro lado, Tsag 2 e Tsag 7 apresentaram

100% de concordância com TsCa em relação ao soros negativos mas foram incapazes de identificar a maioria dos soros positivos.

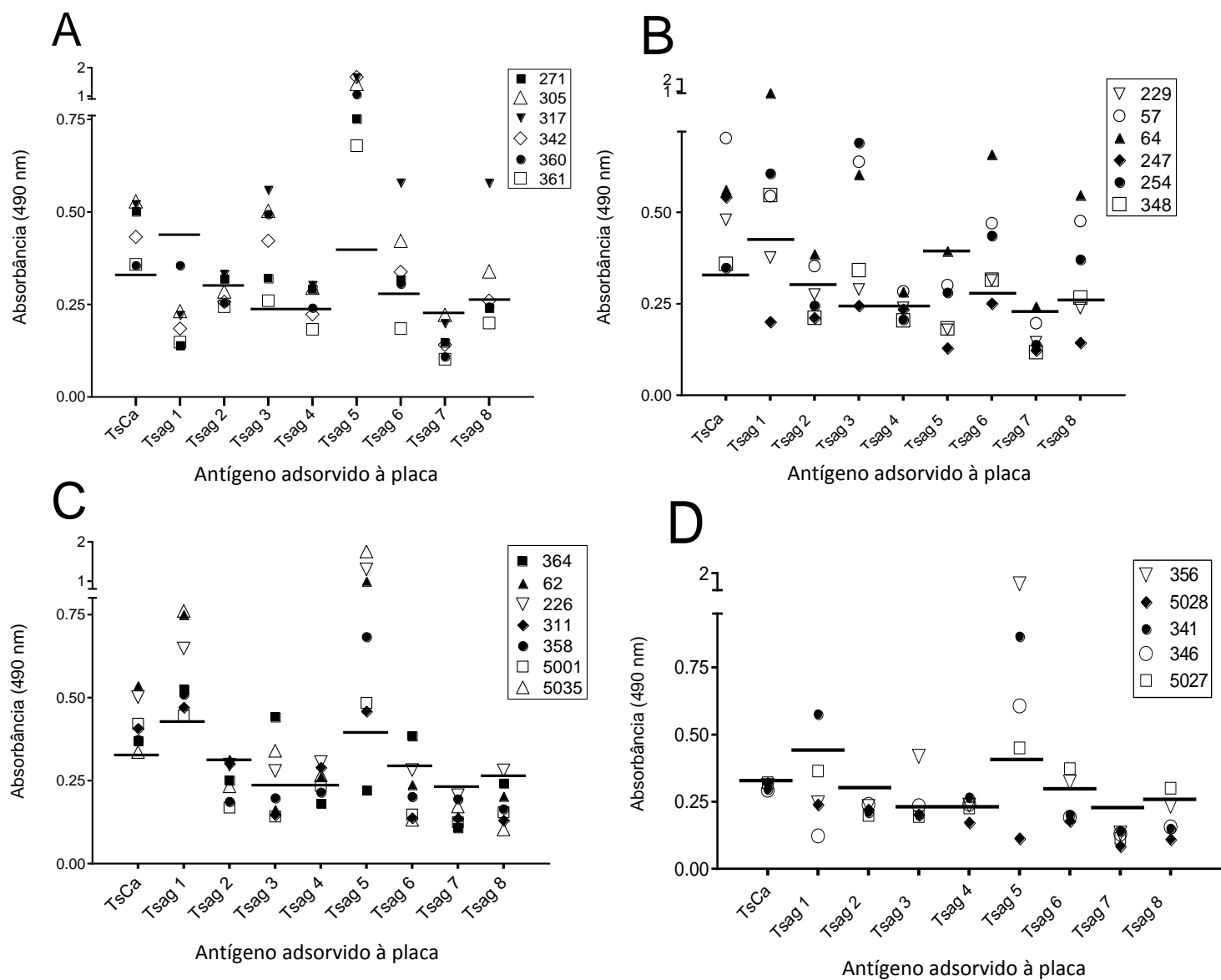


GRÁFICO 2: Comparação de reatividade entre TsCa e mimotopos obtidos por phage display. Vinte e quatro soros bovinos sendo 5 deles certamente negativos para cisticercose foram avaliados.

A melhor concordância com TsCa foi obtida quando Tsag 3 foi usado como antígeno. Ele foi capaz de indicar 15 dos 19 soros positivos (Figura 9 – A, B, C) e 4 dos 5 soros negativos

## **5.5 ENSAIOS DE COMPETIÇÃO**

A maioria dos mimotopos expostos nos fagos incluindo o pool de fagos, foram capazes de competir pelos anticorpos após prévia incubação, reduzindo a reatividade do TsCa em média de 30%. Tsag 2 e Tsag 4 não foram capazes de prejudicar a interação do TsCa com os anticorpos como os outros, reduzindo a reatividade em 26% e 22% respectivamente. Como esperado, o fago tipo selvagem não apresentou influencia na interação entre os anticorpos bovinos e TsCa (Figura 10 A).

Por outro lado, quando o soro bovino foi previamente incubado com TsCa em diferentes concentrações (10, 100 e 500 µg/mL) e ensaiado contra os peptídeos expostos por fagos, houve pouco decréscimo na absorbância em comparação com o ensaio sem o competidor, embora com diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ). A única exceção ocorreu com Tsag 3 em que o uso de 10 µg/mL de TsCa como competidor não influenciou a interação de Tsag 3 com os anticorpos. A diferença entre as absorbâncias usando nenhum competidor ou TsCa apenas foi estatisticamente significativa quando concentrações maiores de competidor (100 e 500 µg/mL) foi utilizado (Figura 10B).

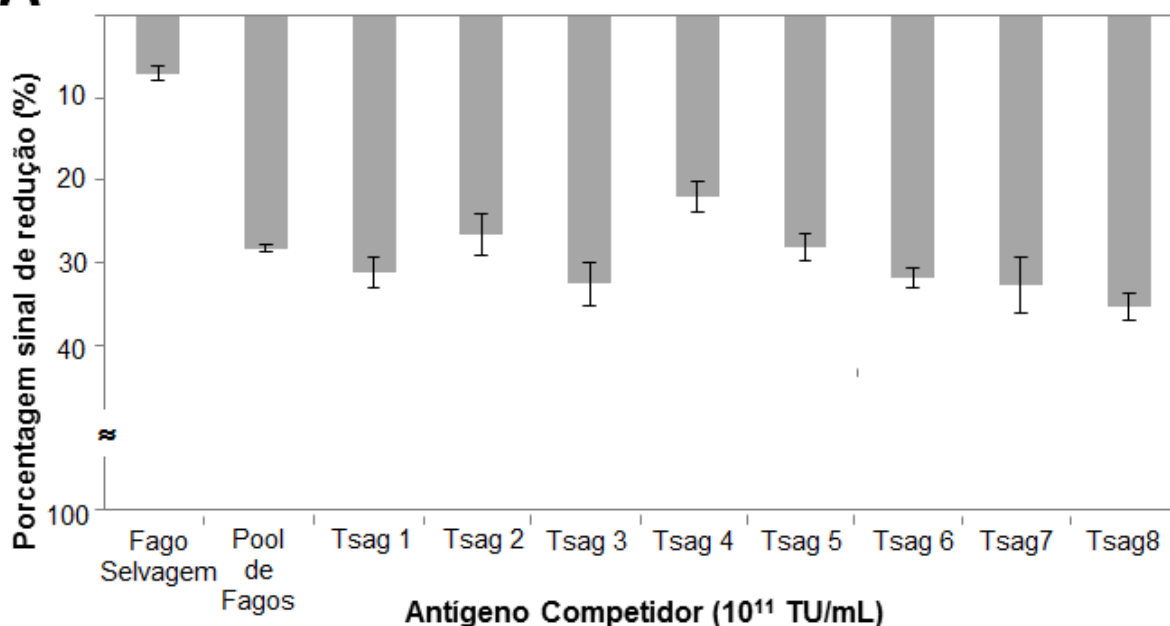
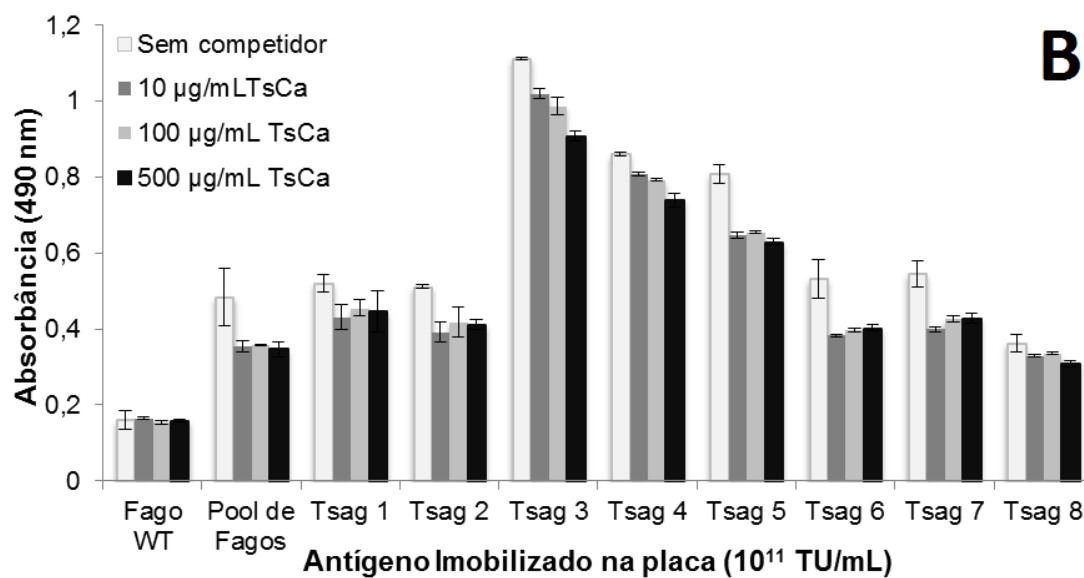
**A****B**

GRÁFICO 3: ELISA de competição. (A) Alto título de soro bovino diluído 1:600 foi pré-incubado (37 °C, 1h) com fago selvagem ( $10^{11}$  TU/mL) ou clones de fagos e testado em microplacas sensibilizadas com TsCa (10 µg/ml). A reatividade do soro bovino com alta

reatividade ao TsCa considerando 100% foi usado como referência. (B) Soro de alto título diluído em 1:600 foi pré-incubado (37 °C, 1h) com TsCa 10 µg/ml, 100 µg/ml or 500 µg/ml e ensaiado em microplacas sensibilizadas com fagos ( $10^{11}$  TU/mL). A diferença entre as absorbâncias relacionada coma reatividade de cada peptídeo obtido exposto em fagos com o soro bovino na presença ou ausência do competidor foi estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) com exceção do Tsag 3 na qual não houve competição usando o TsCa 10 µg/ml. Em ambos os experimentos, a reação foi detectada pelo uso do anticorpo anti-bovino conjugado a horseradish peroxidase diluído em 1:7500.

## 5.6 ALA SCANNING

Com o intuito de caracterizar a interação entre os mimotopos obtidos por phage display em relação aos soros bovinos positivos para *T. saginata*, 3 peptídeos e uma série derivada de análogos de alanina foram ensaiados para reatividade do soro. Os peptídeos que apresentaram alanina na sequencia original tiveram o resíduo substituído por serina durante a síntese na membrana de SPOT.

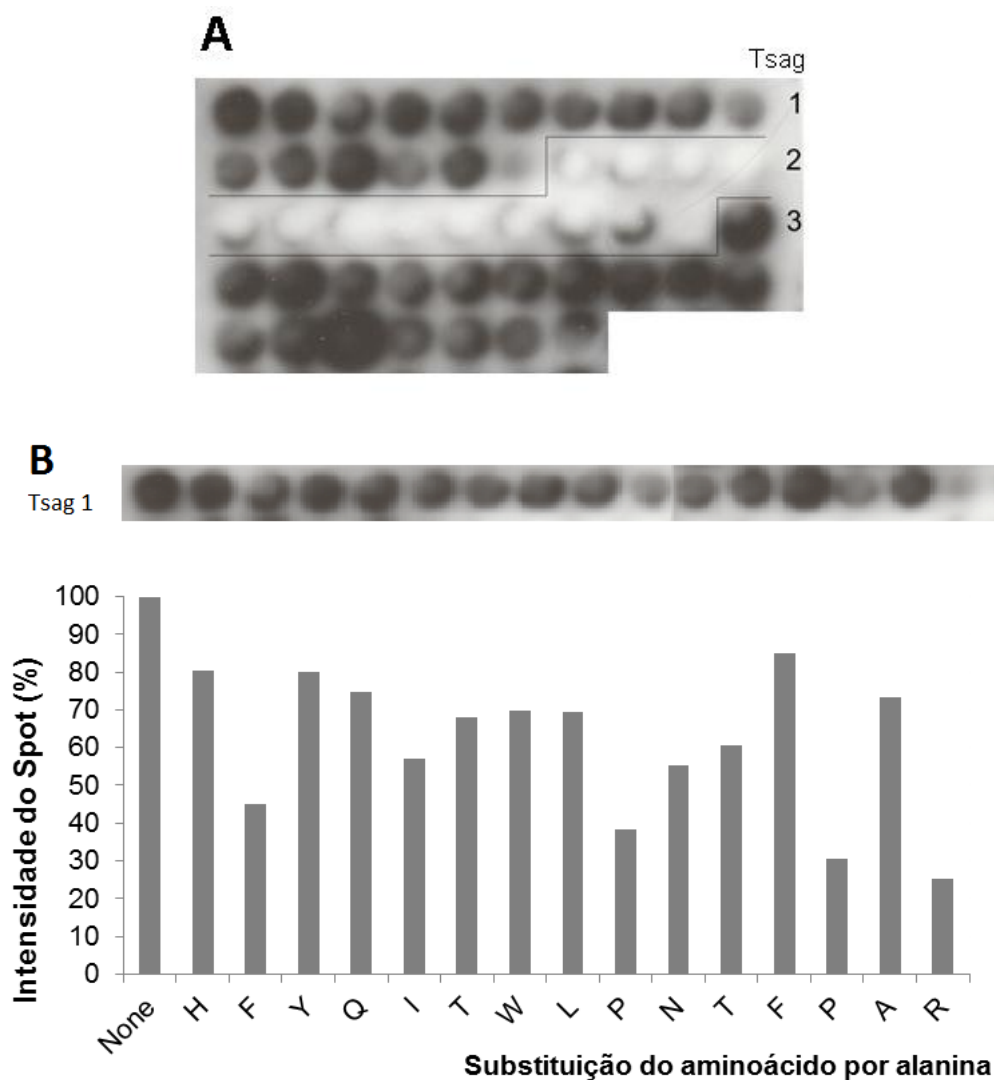
Tsag 1 e Tsag 3 foram escolhidos pelo fato de serem os mais prevalentes na seleção por phage display e por apresentarem melhor concordância com TsCa no ELISA, respectivamente. Curiosamente, Tsag 1 e 3 são peptídeos de 15- e 17-mer, respectivamente. Então, com o intuito de incluir um peptídeo com 12-mer, Tsag 2 foi escolhido aleatoriamente como um exemplar da biblioteca de 12-mer.

Dentre os 3 peptídeos testados, somente o peptídeo Tsag 2 (TCIWQWPDWACK) não exibiu reatividade com o soro bovino positivo para cisticercose (Figura 11B).

Usando soro bovino policlonal, o ala scanning dos peptídeos Tsag 1 (HFYQITWLPNTFPAR) e Tsag 3 (VHTSIRPRCQPRAITPR) indicou que alguns resíduos quando substituídos foram responsáveis por um decréscimo no reconhecimento do anticorpo em comparação com o peptídeo sem substituição de

aminoácidos. A substituição de R15 em Tsag 1 (Figura 11B) inibiu quase completamente a ligação, enquanto a alanina ao invés de F2, P9, P13 e R15, diminuiu a reatividade em pelo menos a metade.

Em relação ao Tsag 3 (Figura 4C), o A 13 substituído por serina aumentou levemente a ligação do peptídeo aos anticorpos em comparação com o peptídeo sem modificação. Por outro lado, foi possível verificar a influência de S4 e I14 na reatividade. Interessantemente, assim como ocorrido em Tsag 1, este experimento indicou um importante papel de algumas prolínas (P11 e P16) e argininas (R6 e R17) cuja ausência diminuiu a reatividade entre 42 e 66%.





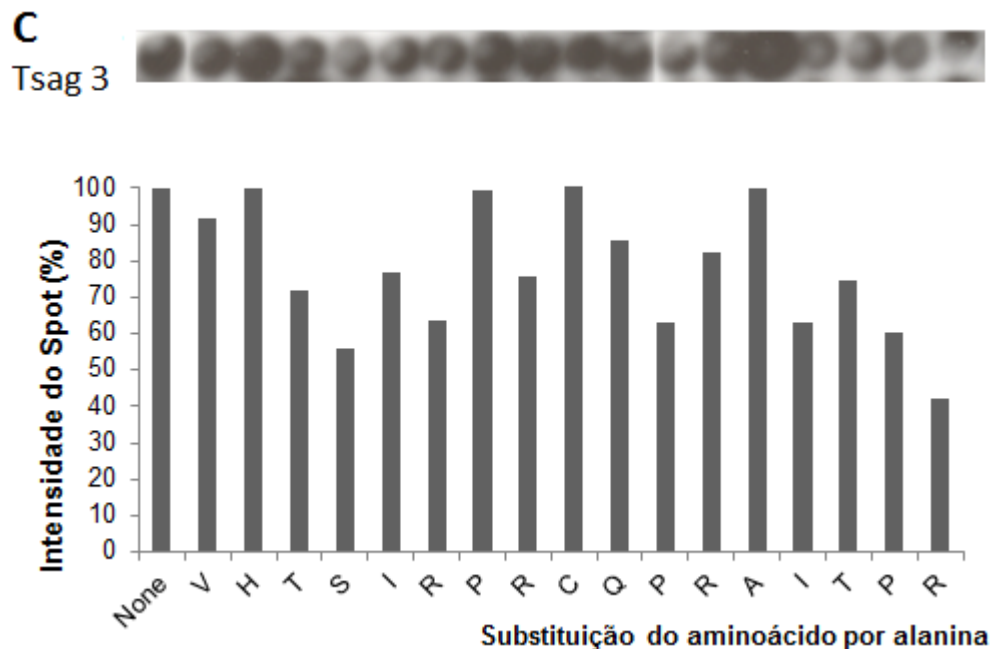


GRÁFICO 4: Scanning por alanina de 3 peptídeos lineares selecionados por phage display em uma membrana de SPOT. (A) Reatividade antigênica de peptídeos identificados por phage display ligados à celulose com *pool* de soro bovino positivo (1:3000) detectado por anticorpo anti-bovino conjugado a *horseradish peroxidase* (1:30.000). (B) Análise quantitativa da reatividade de SPOT dos peptídeos. Cada barra representa a reatividade de um peptídeo cuja sequência contém Ala ou seus homólogos contendo Ser no lugar do aminoácido indicado. O peptídeo referência na primeira posição (primeira barra) foi usado como controle. A intensidade do SPOT foi mensurada com software ImageJ.

## 5.7 ANÁLISE DE SEQUENCIA

Utilizando programas computacionais foi encontrada semelhança entre proteínas já descritas em banco de dados com os mimotopos, Tsag 1 a Tsag 8, conforme ilustra a Tabela.

TABELA 4: ANÁLISE DA IDENTIDADE DOS MIMOTOPOS

Mimotopo	Proteína Identificada	Sequencia
Tsag 1 (HFYQITWLPNTFPAR)	Calcineurina A ( <i>Echinococcus multilocularis</i> )	CSSHPYWLPNFMDFV 360 -HFYQITWLPNTFPAR- : ****:..
	NADH desidrogenase subunidade 4 ( <i>Taenia hydatigena</i> )	HTWLPIVHAEAT 60-120 -TWLPNTFPAR- **** ..
Tsag 2 (TCIWQWPDWACK)	Proteína ribossomal L37a ( <i>Taenia crassiceps</i> )	GIWACKRC 60 --WACK-- 12 ****
	Precursor de Ag5 ( <i>Echinococcus granulosus</i> )	CGGTLITPRWVLT 240 CQPRAITPR---- 17 * ****
Tsag 4 (MGIRALPPCQ <sup>u</sup> NARQ <sup>u</sup> RLS)	Receptor putativo da insulina ( <i>Echinococcus multilocularis</i> )	PPCQDFEKSTSN-1680 PPCQ <sup>u</sup> NARQ <sup>u</sup> RLS--17 ****: .: *

Tsag 5 (LSTHTKLNKADI <u>Q</u> MP)	Hsc 70 ( <i>Taenia asiatica</i> )	LRDAKLDKADIH 120 -THTKLNKADIQ 11 . : * * : * * * * :
	Subunidade $\alpha$ da bomba transportadora de sódio/potássio	VNDSPALKKADIGVA 720 LSTHTKLNKADIQMP 11 . . * : * * * * : .
	Fator de interação RAB ( <i>Taenia asiatica</i> )	RFRWPSLRHSSFRRK 60 -YRWPSTPSAS--RQ 12 : * * * * : * * :
Tsag 6 (YRWPSTPSASR <u>Q</u> ATL)	Variante de cadeia leve da dineína ( <i>Taenia asiática</i> )	SRPSSGSASR 240 -WPSTPSASR-15 * * : * * * *
	Proteína putativa relacionada a HSP20 ( <i>Echinococcus multilocularis</i> )	DRNHIQATLTSDDVL 180 SR---QATL----- 15 . * * * * *
	Proteína FOX K1 ( <i>Taenia asiática</i> )	VHCQPKSLHVLRL 120 -HCQP----- 8 * * * * *
Tsag 7 (GAARHC <u>Q</u> PASPATMM)	Proteína HBX1 ( <i>Echinococcus granulosus</i> )	SMSTCAKTVTK 120 CMSTCS-----12 . * * * * :
	Proteína moduladora de actina [ <i>Echinococcus multilocularis</i> ]	STCSAFEKSL 240 STCSGLK----12 * * * * . : :
	Proteína moduladora de actina [ <i>Echinococcus multilocularis</i> ]	STCSAFEKSL 240 STCSGLK----12 * * * * . : :

“\*”: idêntico; “.”: substituições conservadas e “.”: substituições semi-conservadas.

## 6. DISCUSSÃO

A técnica de phage display tem sido usada como ferramenta biotecnológica no estudo para o desenvolvimento de vacinas (CUI *et. al.* 2013; ZHONG *et. al.*, 2011) e no imunodiagnóstico de doenças (HEO *et. al.* 2012; ALBAN *et. al.*, 2013; CALDINI, 2012; DONG *et. al.* 2013), como a cisticercose (HELL, 2009; CAPELLI-PEIXOTO, 2011).

A cisticercose bovina, causada pelo *C. bovis*, é uma zoonose de grande impacto em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento e causa enormes prejuízos econômicos para a pecuária. O método de “corta e olha” é o atualmente utilizado para se verificar a presença de cisticercos em carcaças bovinas e não consiste em um método de diagnóstico sensível (BRASIL, 1952; DORNY *et. al.*, 2000; ALLEPUZ, 2012). Tendo em vista a falta de um método eficiente de diagnóstico da cisticercose bovina, procuramos com o auxílio da técnica de phage display identificar peptídeos que reconhecessem anticorpos presentes no soro de bovinos infectados com a cisticercose bovina a fim de propor um método de diagnóstico mais sensível e específico.

Com o auxílio da técnica de *Phage Display* selecionamos bibliotecas de fagos com base em sua reatividade frente a soro de bovinos parasitados com a cisticercose. No ensaio de seleção ou biopanning dos fagos obtivemos reatividade crescente, em relação aos anticorpos bovinos testados, até o quinto ciclo de seleção apresentando valor inferior ao do antígeno bruto de metaestódeo de *C. bovis*. A taxa de recuperação dos fagos foi crescente até o quarto ciclo de seleção decaindo no quinto ciclo. Entretanto, a reatividade dos fagos foi crescente conforme os ciclos.

Para a eluição dos fagos utilizamos a estratégia de competição também utilizada por Ribeiro e colaboradores (2010), porém diferente da utilizada por Gazarian e colaboradores (2000), Robles e colaboradores. (2005), González e colaboradores (2010) e Gazarian e colaboradores (2012) que efetuaram eluição dos fagos por acidez. A eluição dos fagos por acidez utiliza a diferença de pH para remover o fago ligante e tende a reduzir a interação do fago com o alvo, desnaturar ou degradar o alvo ou o peptídeo exposto no fago. É um método de eluição menos específico. Nos casos em que os ligantes de um alvo em particular são conhecidos e disponíveis, a eluição por

competição é preferível por ser menos agressiva e mais específica, por isso optamos por esse método de eluição (LUNDER *et al.*, 2008; VODNIK *et al.*, 2011).

No nosso trabalho, conseguimos isolar 8 mimotopos ou peptídeos expressos em superfícies de fagos que apresentaram alta reatividade frente aos soros bovinos. No trabalho desenvolvido por González e colaboradores (2010), o DNA genômico de *T. solium* foi fusionado à proteína VIII do fago M13 e os peptídeos foram selecionados com soro de camundongo anti *T. crassiceps*. Conseguiram obter apenas 2 clones reativos.

Novamente de forma semelhante, Gazarian e colaboradores (2000) imunizaram coelhos com uma sequência peptídica correspondente à proteína paramiosina para a obtenção de anticorpos que foram utilizados para selecionar peptídeos de uma biblioteca de fagos. Selecionaram-se 14 peptídeos que foram testados com soro de suínos ou pacientes com neurocisticercose. Nenhum dos peptídeos foi reconhecido pelos soros testados. Isso pode se dever ao fato da imunização ter sido realizada em coelhos, que por serem de uma espécie diferente, podem apresentar antígenos outros que aqueles apresentados pelo sistema imunológico humano ou de suíno. No nosso trabalho conseguimos selecionar com êxito peptídeos que reconhecem soros de bovinos positivos para cisticercose.

Após a análise de sequência destes peptídeos obtidos não encontramos sequência consenso entre eles assim como Manhani e colaboradores (2011) que selecionaram peptídeos ligantes de IgY de galinhas imunizadas com extrato salino total de metacestódeos de *T. solium*. Dos 48 clones selecionados, 26 apresentaram sequências semelhantes, mas sem sequência consenso entre os peptídeos avaliados.

Os aminoácidos mais frequentes dentre os mimotopos selecionados neste trabalho foram a prolina, a treonina, a arginina e a serina. Com exceção do peptídeo Tsag 8, todos contêm a prolina em sua estrutura. Manoutcharian e colaboradores (1999) utilizaram a técnica de phage display para obter mimotopos de *Taenia solium*, que apresenta semelhança filogenética com a *T. saginata*, e obtiveram peptídeos em

cujas sequências 17,7% eram prolina, 15,9% serina e 8,4% arginina. A maior prevalência de prolina e serina corrobora com o nosso estudo.

Ribeiro e colaboradores (2010) isolaram peptídeos que identificaram anticorpos presentes em soro de pacientes com neurocisticercose. Mais uma vez dentre os aminoácidos mais frequentes encontrados, estava a prolina, corroborando com o nosso estudo, e dentre os menos frequentes estavam a arginina e a serina, diferente do que foi observado pelo nosso grupo.

No ensaio de Ala scanning (Figura 11) realizado na membrana de SPOT síntese, notamos que a substituição de cada um dos resíduos de aminoácidos por alanina no peptídeo Tsag 1 diminuiu a reatividade em todas posições estudadas. A substituição de resíduos de prolina, arginina e fenilalanina por resíduos de alanina, contribuiu para a diminuição da reatividade do peptídeo correspondente ao Tsag 1.

Já no caso do peptídeo referente ao Tsag 3, a reatividade se mantém constante quando os resíduos de histidina, prolina (7ª posição), cisteína e alanina são substituídos. A reatividade diminui quando os resíduos de prolina, arginina e serina foram alterados mostrando que para esse mimotopo, a presença desses aminoácidos foi importante para o reconhecimento. O peptídeo Tsag 2 não apresentou evidências de reatividade neste ensaio talvez por ser um peptídeo conformacional, uma vez que fora sintetizado linearmente, ou seja, sem a presença da ponte dissulfeto. A conformação para alguns peptídeos é fundamental para o reconhecimento de anticorpos presentes no soro bovino, sendo preservada quando exposta na superfície de fagos e não quando sintetizada quimicamente, por isso houve a detecção de reatividade no ELISA utilizando os fagos.

Existe uma grande dificuldade na obtenção de animais certamente negativos ou parasitados apenas com a *T. saginata* para serem usados com finalidade experimental. No ensaio de ELISA correspondente a figura 9, testamos diferentes soros bovinos positivos, em relação ao antígeno bruto (Minozzo *et. al.*, 2004), e negativos, proveniente de animais que foram minuciosamente inspecionados avaliando cada região muscular e as vísceras. Neste ensaio podemos evidenciar as diferenças de

reatividade para cada peptídeo analisado. O fato de alguns soros certamente negativos serem considerados positivos pode se dever ao fato da existência de reação cruzada com anticorpos produzidos contra outros parasitos, fato a ser comprovado, muito embora tenhamos dificuldade em encontrar bovinos sem parasitoses devido ao caráter extensionista da pecuária brasileira

Alguns animais positivos em relação ao antígeno bruto não foram considerados positivos em relação ao fago, como por exemplo, o peptídeo referente ao Tsag 7 que quase não identificou animais positivos. Esse fato é curioso tendo em vista que fora uma sequência peptídica selecionada com anticorpos específicos para o antígeno bruto de metacestódeos de *T. saginata*.

No primeiro ensaio de ELISA de competição (Figura 10A), o peptídeo representado por Tsag 8 está relacionado com o maior porcentagem de inibição, em torno de 35%, seguido pelo Tsag 3 e pelo Tsag 7. O Tsag 4 foi o que demonstrou menor porcentagem de inibição. A média da porcentagem de inibição ficou em torno de 30%. Esse experimento evidencia a especificidade de ligação do soro aos peptídeos expressos nos fagos apesar de ter havido pouca diminuição dos valores da absorbância. Esse fato era esperado, uma vez que os soros dos bovinos são policlonais, ou seja, um conjunto de anticorpos diferentes que reconhecem epítomos diferentes. O uso de anticorpos monoclonais ou de policlonais purificados contra determinada proteína poderia aumentar a porcentagem de inibição visto que a resposta imune seria totalmente direcionada para um determinado antígeno ou epítomo.

Guo e colaboradores (2010) produziram anticorpos monoclonais para o antígeno TSOL 18, proteína que vem sendo usada com sucesso na vacinação de suínos contra *T. solium*. A seguir, esses anticorpos foram usados para selecionar peptídeos através de *phage display*. No ensaio de ELISA de competição com o antígeno TSOL18 imobilizado na placa e competindo com os fagos, eles obtiveram redução de 50% da reatividade, utilizando fagos com peptídeos de interesse e 10% de redução com o fago silvestre, evidenciando aqui a diferença tendo em vista o uso de um anticorpo monoclonal.

No segundo ensaio de competição foram testadas 3 diferentes concentrações de antígeno bruto para avaliar a capacidade de ligação do peptídeo ao soro bovino. Constatamos que houve um decréscimo estatisticamente significativo nos valores de absorbância em relação ao ensaio sem competidor, com exceção do Tsag 3 que diminuiu a absorbância com doses maiores do antígeno bruto, acima de 10 µg/mL.

O fago selvagem foi capaz de inibir, em baixa porcentagem, a ligação do soro ao antígeno bruto imobilizado na placa nesse ensaio. Isso se deve ao fato de ele não expressar em sua superfície um peptídeo que seja capaz de reconhecer os anticorpos presentes no soro de bovinos com cisticercose.

Ribeiro e colaboradores (2010) realizaram um ensaio de ELISA de competição para testar a eficiência de ligação de peptídeos selecionados com o soro de pacientes com neurocisticercose em comparação à ligação ao antígeno bruto de *T. solium*. Nesse ensaio, embora não tenha sido mostrada a porcentagem de inibição, aparentemente foi próxima a 100% quando se utilizou  $10^{10}$  fagos/ml para competir. Além disso, eles mostraram que a inibição é dose dependente, quanto mais fagos foram adicionados, maior foi o valor da inibição.

Gazarian e colaboradores (2012) utilizaram a técnica de *Phage Display* para a obtenção de mimotopos de *T. solium*. No ensaio de competição, demonstraram diminuição da reatividade quando o antígeno bruto total de *T. solium* (10 µg/mL) foi adicionado na placa sensibilizada com os mimotopos selecionados indicando a ocorrência de competição pelos anticorpos.

Analisando a similaridade de sequência dos mimotopos obtidos com as proteínas depositadas no banco de dados (Blast) obtivemos algumas identidades conforme ilustrado na tabela 4. O critério utilizado baseou-se no alinhamento de 4 sequências de aminoácidos o que pode não ser suficiente para se definir a identidade de uma sequência.

O Tsag3 apresentou similaridade com o antígeno 5 de *Echinococcus granulosus*, um antígeno que vem sendo estudado para ser utilizado no diagnóstico da hidatidose e



estudos sugerem a existência dessa molécula em *Taenia solium* e o seu uso no diagnóstico da neuricisticercose (RUEDA *et al.*, 2011)

A proteína relativa a um dos clones obtidos por González *et. al.* (2010) teve alguma homologia com uma proteína de *Giardia intestinalis*. Ele alega que isso pode ter acontecido devido às escassas informações ainda existentes nos bancos de dados sobre as sequências protéicas desses parasitas.

Os fagos filamentosos apresentam claras vantagens em relação aos antígenos recombinantes convencionais ou frações antigênicas purificadas usadas no imunodiagnóstico ou ferramentas de vacinas visto que sua produção em larga escala é simples e econômica, permitindo a rápida produção de preparações antigênicas homogêneas e estáveis. Comparativamente, antígenos brutos obtidos de *Cysticercus bovis* constituem uma mistura complexa que contém proteínas ou tecidos animais na sua composição, podendo representar um risco biológico.

## 7. CONCLUSÃO

Os ciclos de seleção foram eficientes na seleção de mimotopos de *T. saginata* visto o aumento da reatividade apresentada em cada ciclo.

A sequencia encontrada mais prevalente foi a correspondente ao Tsag1 indicando uma alta imunogenicidade desse mimotopo.

Os aminoácidos mais frequentes encontrados dentre as sequencias de mimotopos obtidas foram a prolina, a alanina e a treonina.

O Tsag3 apresentou a melhor concordância com o antígeno bruto quando foram testados soros de bovinos, identificando 15 dos 19 soros positivos e 4 dos 5 soros negativos.

Os mimotopos e o pool de fagos foram capazes de reduzir a reatividade do antígeno bruto com soro de bovino em torno de 30% indicando competição pelos anticorpos. O fago selvagem apresentou competição inferior a 10%, não influenciando a ligação aos anticorpos. O Tsag3 apresentou a maior reatividade mesmo na presença de competidor e foi necessária uma maior concentração de antígeno bruto, 100 e 500 µg/mL, para que ocorresse competição estatisticamente significativa pelos anticorpos bovinos.

Os aminoácidos mais importantes para a manutenção de reatividade do Tsag1 são a fenilalanina, as prolinas e a arginina, e para o Tsag 3 são a serina, as prolinas nas posições 11 e 16 e a arginina na posição 17.

Pela análise de similaridades de sequencias o Tsag3 apresentou correspondência com o antígeno 5 de *Echinococcus granulosos*, um antígeno que vem sendo estudado para ser utilizado no diagnóstico de hidatidose e evidências sugerem sua presença em *Taenia solium* podendo servir como marcador da neurocisticercose.

Os dados apresentados apontam para o Tsag3 como potencial marcador da cisticercose bovina e como candidato a ser utilizado em ensaios de imunodiagnóstico dessa doença.

Nossos resultados nos encorajam a continuar a pesquisa, por que os peptídeos mostraram-se promissores no sentido de sua utilização em outros experimentos que envolvam bovinos.

## 8. PERSPECTIVAS

- Testar por ELISA a imunorreatividade de cada clone individualmente, utilizando-se soros de bovinos com outras parasitoses, para avaliação da especificidade do antígeno.
- Sintetizar quimicamente as sequências de peptídeos mais antigênicas e específicas para detecção da cisticercose bovina e avaliar a capacidade de identificar os bovinos parasitados.
- Avaliar a proteção de cada peptídeo, individualmente ou constituindo-se de um *pool*, contra infecção experimental em bovinos.
- Produzir anticorpos poli e/ou monoclonais contra cada um dos peptídeos para análise de sua imunolocalização em cistos viáveis e calcificados de *C. bovis*.
- Verificar se os anticorpos produzidos contra cada um dos mimotopos são capazes de discernir entre antígenos de cistos viáveis dos calcificados de forma a realizar o diagnóstico diferencial

## 9. REFERÊNCIAS

ABIPECS. Disponível em: <<http://www.abipecs.com.br/>>. Acessado em: fevereiro de 2013.

ABUSEIR, S., KUHNE, M., SCHNEIDER, T., KLEIN, G., & EPE, C. (2007) Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. Parasitology Research.

AGROLINK Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/>>. Acessado em: fevereiro de 2013.

ALBAN, S. M., DE MOURA, J. F., MINOZZO, J. C., MIRA, M. T., & SOCCOL, V. T. (2013). Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. BMC.Infect.Dis. 13, 42

ALLEPUZ, A., GABRIEL, S., DORNY, P., NAPP, S., JANSEN, F., VILAR, M. J., VIVES, L., PICART, L., ORTUNO, A., GUTIERREZ, J., & CASAL, J. (2012). Comparison of bovine cysticercosis prevalence detected by antigen ELISA and visual inspection in the North East of Spain. Research in Veterinary Science 92, 393-395.

ASAAVA, L. L., KITALA, P. M., GATHURA, P. B., NANYINGI, M. O., MUCHEMI, G., & SCHELLING, E. (2009) A survey of bovine cysticercosis/human taeniosis in Northern Turkana District, Kenya. Preventive Veterinary Medicine.

AZZAZY, H. M. & HIGHSMITH, W. E., JR. (2002). Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clinical Biochemistry 35, 425-445.

BAERISWYL, V. & HEINIS, C. (2013). Phage selection of cyclic peptide antagonists with increased stability toward intestinal proteases. Protein Eng Des Sel 26, 81-89.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Rio de Janeiro. 1952.

BUHRMAN, J. D. & SLANSKY, J. E. (2013). Improving T cell responses to modified peptides in tumor vaccines. *Immunologic Research* 55, 34-47.

CALDINI, C. P., XANDER, P., KIOSHIMA, E. S., BACHI, A. L., DE CAMARGO, Z. P., MARIANO, M., & LOPES, J. D. (2012). Synthetic peptides mimic gp75 from *Paracoccidioides brasiliensis* in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 174, 1-10.

CAPELLI-PEIXOTO, J., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., CHAVES-MOREIRA, D., MINOZZO, J. C., GABARDO, J., TEIXEIRA, K. N., THOMAZ-SOCCOL, V., ALVARENGA, L. M., & DE MOURA, J. (2011). Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis. *Vaccine* 29, 9473-9479.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/>>. Acessado em: fevereiro de 2013.

CHIESA, F., DALMASSO, A., BELLIO, A., MARTINETTI, M., GILI, S., & CIVERA, T. (2010). Development of a biomolecular assay for postmortem diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis. *Foodborne Pathogens and Disease*.

CORTESE, R., FELICI, F., GALFRE, G., LUZZAGO, A., MONACI, P., & NICOSIA, A. (1994). Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage. *Trends in Biotechnology* 12, 262-267.

CUI, J., REN, H. J., LIU, R. D., WANG, L., ZHANG, Z. F., & WANG, Z. Q. (2013). Phage-displayed specific polypeptide antigens induce significant protective immunity against *Trichinella spiralis* infection in BALB/c mice. *Vaccine* 31, 1171-1177.

DA, S. R., V, MANHANI, M. N., CARDOSO, R., VIEIRA, C. U., GOULART, L. R., & COSTA-CRUZ, J. M. (2010). Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. *Immunology Letters* 129, 94-99.

DE MOURA, J., FELICORI, L., MOREAU, V., GUIMARAES, G., DIAS-LOPES, C., MOLINA, L., ALVARENGA, L. M., FERNANDES, P., FREZARD, F., RIBEIRO, R. R., FLEURY, C., NGUYEN, C., MOLINA, F., GRANIER, C., & CHAVEZ-OLORTEGUI, C. (2011). Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine* 29, 7992-8001.

DONG, J., OTSUKI, T., KATO, T., KOHSAKA, T., IKE, K., & PARK, E. Y. (2013). Development of two murine antibodies against *Neospora caninum* using phage display technology and application on the detection of N. caninum. *PLoS One*. 8, e53264.

DORNY, P., VERCAMMEN, F., BRANDT J., VANSTEENKISTE W., BERKVEN D., & GEERTS S (2000). Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. *Veterinary Parasitology*. 2000.

DORNY, P. & PRAET, N. (2007). *Taenia saginata* in Europe. *Veterinary Parasitology* 149, 22-24.

DUTRA, L. H.; GIROTTI, A.; VIEIRA, R. F. C.; VIEIRA, T. S. W. J.; ZANGIROLAMO, A. F.; MARQUÊS, F. A. C.; HEADLEY, S. A.; & VIDOTTO, O. (2012) The prevalence and spatial epidemiology of cysticercosis in slaughtered cattle from Brazil. *Ciências Agrárias*, 33, n. 5, p. 1887-1896.

EDDI, C., KATALIN, D. B., JUAN, L., WILLIAM, A., ANDREW, S., DANIELA, B., & JOSEPH, D. (2006). Veterinary public health activities at FAO: cysticercosis and echinococcosis. *Parasitol.Int.* 55 Suppl, S305-S308.

FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSEKBERGER, U., & BALL, L. A. (2005). *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.*

FERRER, E., BENITEZ, L., FOSTER-CUEVAS, M., BRYCE, D., WAMAE, L. W., ONYANGO-ABUJE, J. A., GARATE, T., HARRISON, L. J. S., & PARKHOUSE, R. M. E (2003). *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. *Veterinary Parasitology.*

FERRER, E., GONZÁLEZ, L. M., MARTÍNEZ-ESCRIBANO, J. A., GONZÁLEZ-BARDERAS, M. E., CORTÉZ, M. M., DÁVILA, I., HARRISON, L. J. S., PARKHOUSE, R. M. E., & GÁRATE, T. (2007). Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. *Parasitology Research.* 2007.

GAZARIAN, K. G., GAZARIAN, T. G., SOLIS, C. F., HERNANDEZ, R., SHOEMAKER, C. B., & LACLETTE, J. P. (2000). Epitope mapping on N-terminal region of *taenia solium* paramyosin. *Immunology Letters* 72, 191-195.

GAZARIAN, K., ROWLAY, M., GAZARIAN, T., VAZQUEZ BUCHELLI, J. E., & HERNANDEZ, G. M. (2012). Mimotope peptides selected from phage display combinatorial library by serum antibodies of pigs experimentally infected with *Taenia solium* as leads to developing diagnostic antigens for human neurocysticercosis. *Peptides* 38, 381-388.

GEYSEN, H. M., RODDA, S. J., & MASON, T. J. (1986). A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Molecular Immunology* 23, 709-715.

GIROTTI, A., PINTO, P. S. A., DIAS, J. C. O., CHAVES, L. S., & FERREIRA, H. C. C. (2008). Detecção de peptídeos importantes para o diagnóstico da cisticercose bovina no *immunoblot*. *Ciência Rural*.

GONZALEZ, E., ROBLES, Y., GOVEZENSKY, T., BOBES, R. J., GEVORKIAN, G., & MANOUTCHARIAN, K. (2010). Isolation of neurocysticercosis-related antigens from a genomic phage display library of *Taenia solium*. *J.Biomol.Screen.* 15, 1268-1273.

GUO, A., CAI, X., JIA, W., LIU, B., ZHANG, S., WANG, P., YAN, H., & LUO, X. (2010). Mapping of *Taenia solium* TSOL18 antigenic epitopes by phage display library. *Parasitology Research* 106, 1151-1157.

HAQ, I. U., CHAUDHRY, W. N., AKHTAR, M. N., ANDLEEB, S., & QADRI, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol.J.* 9, 9.

HE, Y., WANG, Y., STRUBLE, E. B., ZHANG, P., CHOWDHURY, S., REED, J. L., KENNEDY, M., SCOTT, D. E., & FISHER, R. W. (2012). Epitope mapping by random peptide phage display reveals essential residues for vaccinia extracellular enveloped virion spread. *Virol.J.* 9, 217.

HELL, R. C., AMIM, P., DE ANDRADE, H. M., DE AVILA, R. A., FELICORI, L., OLIVEIRA, A. G., OLIVEIRA, C. A., NASCIMENTO, E., TAVARES, C. A., GRANIER, C., & CHAVEZ-OLORTEGUI, C. (2009). Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. *Clinical Immunology* 131, 129-138.

HEO, C. K., HWANG, H. M., RUEM, A., YU, D. Y., LEE, J. Y., YOO, J. S., KIM, I. G., YOO, H. S., OH, S., KO, J. H., & CHO, E. W. (2013). Identification of a mimotope for



circulating anti-cytokeratin 8/18 antibody and its usage for the diagnosis of breast cancer. *International Journal of Oncology* 42, 65-74.

JAMES, T. C. & BOND, U. (2012). Molecular mimics of the tumour antigen MUC1. *PLoS.One.* 7, e49728.

JUNIOR, B. R. S. & BITTENCOURT, C. T. Complexo teníase-cisticercose. Em: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias* (2005). José Rodrigues Coura. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.

KAY, B. K., KASANOV, J., & YAMABHAI, M. (2001). Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods* 24, 240-246.

LACEN. Nota técnica nº003/2011. Ementa: Orientação sobre Pesquisa Cisticercose no LACEN/PR.

LAUNE, D., MOLINA, F., FERRIERES, G., VILLARD, S., BES, C., RIEUNIER, F., CHARDES, T., & GRANIER, C. (2002). Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunological Methods* 267, 53-70.

LIMA, R. S., FRANÇA, E. L., HONORIO-FRANÇA, A. C. & FERRARI, C. K. B. (2011). Prevalência de cisticercose bovina e conhecimento sobre a doença em 20 municípios do estado do mato grosso. *Revista Panorâmica Multidisciplinar Barra do Garças - MT* nº 12 p. 46 a 60.

LOPES, W. D., SANTOS, T. R., SOARES, V. E., NUNES, J. L., MENDONÇA, R. P., DE LIMA, R. C., SAKAMOTO, C. A., COSTA, G. H., THOMAZ-SOCCOL, V., OLIVEIRA, G. P., & COSTA, A. J. (2011). Preferential infection sites of *Cysticercus bovis* in cattle

experimentally infected with *Taenia saginata* eggs. *Research in Veterinary Science* 90, 84-88.

LUNDER, M., BRATKOVIC, T., URLEB, U., KREFT, S., & STRUKELJ, B. (2008). Ultrasound in phage display: a new approach to nonspecific elution. *Biotechniques* 44, 893-900.

LUZZAGO, A., FELICI, F., TRAMONTANO, A., PESSI, A., & CORTESE, R. (1993). Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* 128, 51-57.

MACHADO, M. I. Teníase. Em: *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais* (1999). Benjamin Cimerman e Sérgio Cimerman. Editora Atheneu, São Paulo.

MALCOR, J. D., PAYROT, N., DAVID, M., FAUCON, A., ABOUZID, K., JACQUOT, G., FLOQUET, N., DEBARBIEUX, F., ROUGON, G., MARTINEZ, J., KHRESTCHATISKY, M., VLIEGHE, P., & LISOWSKI, V. (2012). Chemical optimization of new ligands of the low-density lipoprotein receptor as potential vectors for central nervous system targeting. *Journal of Medicinal Chemistry* 55, 2227-2241.

MANHANI, M. N., RIBEIRO, V. S., CARDOSO, R., UEIRA-VIEIRA, C., GOULART, L. R., & COSTA-CRUZ, J. M. (2011). Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. *Parasite Immunology* 33, 322-329.

MANOUTCHARIAN, K., SOTELO, J., GARCIA, E., CANO, A., & GEVORKIAN, G. (1999). Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. *Clinical Immunology* 91, 117-121.

MEOLA, A., DELMASTRO, P., MONACI, P., LUZZAGO, A., NICOSIA, A., FELICI, F., CORTESE, R., & GALFRE, G. (1995). Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *Journal of Immunology* 154, 3162-3172.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS) (2008). Guia de Bolso. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 7ª edição revista. Brasília-DF.

MINOZZO, J. C., GUSSO, R. L. F., CASTRO, E. A., LAGO, O., & THOMAZ-SOCCOL, V. (2002). Experimental bovine infection with *Taenia saginata* eggs: recovery rates and cysticerci location. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2002.

MINOZZO, J. C., THOMAZ-SOCCOL, V., OLORTEGUI, C. C., SOARES, V. E., & COSTA, A. J. (2004). Teste Imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética de produção de anticorpos contra *Cysticercus bovis*. *Ciência Rural*. 2004.

MONTEIRO L. L., PINTO, P. S. A., & DIAS, F. S. (2006) Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. *Veterinary Parasitology*.

NOVILHOMS. Disponível em: <[http:// www.novilhoms.com.br/](http://www.novilhoms.com.br/)>. Acessado em: fevereiro de 2013.

OGUNREMI, O., MACDONALD, G., GEERTS, S., & BRANDT, J. (2004) Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis by immunohistochemical test on formalin-fixed and paraffin-embedded bovine lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2004.

OGUNREMI, O., & BENJAMIN, J. (2010) Development and field evaluation of a new serological test for *Taenia saginata* cysticercosis. *Veterinary Parasitology*.

OLIVEIRA, A. F. F; MOREIRA, M. D.; & NOMELINI, Q. S. S. Principais zoonoses detectadas em um matadouro frigorífico do triângulo mineiro e seus impactos na cadeia produtiva. Pós Graduação em Controle de Qualidade na Indústria de Alimentos, FAZU - Faculdades Associadas de Uberaba.

REHAGRO Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/>>. Acessado em: fevereiro de 2013.

REY, L. Tênia e teníases. Em: Parasitologia (2001). Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.

ROBLES, Y., GONZALEZ, E., GOVEZENSKY, T., MUNGIA, M. E., ACERO, G., BOBES, R. J., GEVORKIAN, G., & MANOUTCHARIAN, K. (2005). Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cDNA library and evaluation of their use for diagnosis of neurocysticercosis. *Clinical Immunology* 116, 265-270.

RUEDA, A., SIFUENTES, C., GILMAN, R. H., GUTIERREZ, A. H., PINA, R., CHILE, N., CARRASCO, S., LARSON, S., MAYTA, H., VERASTEGUI, M., RODRIGUEZ, S., GUTIERREZ-CORREA, M., GARCIA, H. H., SHEEN, P., & ZIMIC, M. (2011). TsAg5, a *Taenia solium* cysticercus protein with a marginal trypsin-like activity in the diagnosis of human neurocysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 180, 115-119

SHANMUGAM, A., RAJORIA, S., GEORGE, A. L., MITTELMAN, A., SURIANO, R., & TIWARI, R. K. (2012). Synthetic Toll like receptor-4 (TLR-4) agonist peptides as a novel class of adjuvants. *PLoS.One.* 7, e30839.

SMITH, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.

SMITH, G. P. & PETRENKO, V. A. (1997). Phage Display. Chemical Reviews 97, 391-410.

SOARES, V. E., ANDRADE BELO, M. A., REZENDE, P. C., SOCCOL, V. T., FUKUDA, R. T., DE OLIVEIRA, G. P., & DA COSTA, A. J. (2011). Distribution of *Taenia saginata* metacestodes: a comparison of routine meat inspection and carcass dissection results in experimentally infected calves. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 105, 393-401.

STANGER, K., STEFFEK, M., ZHOU, L., POZNIAK, C. D., QUAN, C., FRANKE, Y., TOM, J., TAM, C., ELLIOTT, J. M., LEWCOCK, J. W., ZHANG, Y., MURRAY, J., & HANNOUSH, R. N. (2012). Allosteric peptides bind a caspase zymogen and mediate caspase tetramerization. Nat.Chem.Biol. 8, 655-660.

THOMAZ-SOCCOL, V., SOUZA, V. K., PESSOA, O. L., MINOZZO, J. C., PESSOA-SILVA, M. C., PEIXOTO, R. P. M. G., MOURA, J. F. (2010). Pesquisa de anticorpos contra *Cysticercus bovis*, por teste ELISA em bovinos de abatedouro. Archives of Veterinary Science.

UNGAR, M. L., & GERMANO, P. M. L. (1992). Prevalência da cisticercose bovina no Estado de São Paulo (Brasil). Revista de Saúde Pública.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA-SAN FRANCISCO. Disponível em: <<http://www.ucsf.edu> //>. Acessado em: fevereiro de 2013.

VAN REGENMORTEL, M. H. (2001). Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. Biologicals 29, 209-213.

VILLA-MANCERA, A., QUIROZ-ROMERO, H., CORREA, D., & ALONSO, R. A. (2011). Proteolytic activity in *Fasciola hepatica* is reduced by the administration of cathepsin L mimotopes. *Journal of Helminthology* 85, 51-55.

VODNIK, M., ZAGER, U., STRUKELJ, B., & LUNDER, M. (2011). Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules*. 16, 790-817.

WAIKAGUL, J., DEKUMYOY, P., & ANANTAPHRUTI, M. T. (2006). Taeniasis, cysticercosis and echinococcosis in Thailand. *Parasitology International*.

WANDRA, T., SUTISNA, P., DHARMAWAN, N. S., MARGONO, S.S, SUDEWI, R., SUROSO, T., CRAIG, P. S., & ITO, A. (2006). High prevalence of *Taenia saginata* taeniasis and status of *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia, 2002 -2004. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006.

WANG, Y., WANG, H., LI, P., ZHANG, Q., KIM, H. J., GEE, S. J., & HAMMOCK, B. D. (2013). Phage-displayed Peptide that Mimics Aflatoxins and its Application in Immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

WINTER, J. (1996). Bacteriophage display libraries. Em: Protein engineering: Principles and practice. Jeffrey L. Cleland & Charles S. Craik. Wiley-Liss Inc.

ZHONG, Y., CAI, J., ZHANG, C., XING, X., QIN, E., HE, J., MAO, P., CHENG, J., LIU, K., XU, D., & SONG, H. (2011). Mimotopes selected with neutralizing antibodies against multiple subtypes of influenza A. *Virol.J.* 8, 542.